

Aus der Klinik für Innere Medizin V /
Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin und dem
Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Chirurgischen Klinik des
Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar

**Transplantation von Lungengewebe in die
Rückenhautkammer der Maus:
Charakterisierung und Homing von endothelialen
Progenitorzellen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2011

Vorgelegt von Nora Anne Regelin
geboren am 29.03.1981 in Hamburg

meiner Großmutter

Eva-Maria Hagenberg

Inhalt

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1.1	DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG	1
1.2	SUMMARY: TRANSPLANTATION OF LUNG TISSUE INTO THE SKINFOLD CHAMBER OF THE MOUSE: CHARACTERIZATION AND HOMING OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS	3
2	EINLEITUNG	5
2.1	<i>In-Vivo</i> MIKROSKOPIE - INTRAVITALE FLUORESCENZMIKROSKOPIE.....	5
2.2	<i>In vivo</i> -MIKROSKOPIE IM RESPIRATIONSTRAKT.....	6
2.2.1	Trachea	6
2.2.2	<i>In-situ</i> - Lungengewebe	8
2.2.3	Ektopes Lungengewebe	10
2.3	RÜCKENHAUTKAMMERMODELLE: EINE KURZE ÜBERSICHT	12
2.4	ANGIOGENESE UND VASKULOGENESE: DEFINITIONEN, BEDEUTUNG BEIM ERWACHSENEN TIER.....	14
2.4.1	Definitionen.....	14
2.4.2	Angioblasten	15
2.4.3	Tumor Angiogenese	16
2.4.4	Angiogenese In Endometriose	17
2.4.5	Angiogenese in Ischämie und Hypoxie	18
2.4.6	Angiogenese in Transplantation	18
2.4.7	Perspektiven	19
2.4.8	Welche Faktoren sind proangiogen, welche antiangiogen? Welche sind bei einem akuten Lungenschaden zu erwarten?	20
2.5	ACUTE LUNG INJURY (ALI) UND ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME (ARDS)	32
2.5.1	Definitionen.....	33
2.5.2	ARDS - eine Krankheit mit hoher Mortalität: Epidemiologie und Geschichte	33
2.5.3	ARDS: Klinik, Auslöser	34
2.5.4	Pathogenese des ARDS.....	34
2.6	READOUTS BEI AKUTEM LUNGENSCHADEN	36
2.7	STAMM- UND PROGENITORZELLEN: WAS SIND DAS?	37
2.8	BEDEUTUNG ENDOTHELIALER PROGENITORZELLEN, ZIRKULIERENDER ENDOTHELIALER PROGENITORZELLEN UND ZIRKULIERENDER ENDOTHELZELLEN.....	41
3	ZIELE DER STUDIEN	49
3.1	CHARAKTERISIERUNG DER LUNGE IN DER RÜCKENHAUTKAMMER	49
3.2	VERGLEICH MIT ENDOMETRIUM	50
3.3	HYPOXIE-HYPEROXIE-SERIEN	50
3.4	ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN	51

3.5 HOMING VON ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN.....	51
4 MATERIAL UND METHODIK.....	52
4.1 VERSUCHSTIERE.....	52
4.2 MODELL RÜCKENHAUTKAMMER	53
4.2.1 Erläuterung des Modells.....	53
4.2.2 Implantation der Rückenhautkammer	55
4.3 INTRAVITALE MIKROSKOPIE	63
4.3.1 Mikrozirkulatorische Parameter.....	66
4.3.1.1 Fläche	67
4.3.1.2 Durchmesser.....	69
4.3.1.3 Flussgeschwindigkeit.....	70
4.3.1.4 Funktionelle Kapillardichte	71
4.3.1.5 Fließverhalten der Leukozyten	71
4.3.1.6 Apoptose	72
4.3.2 Differenzierung Arteriolen und Venolen	72
4.4 PRÄPARATION VON LUNGENGeweBE.....	75
4.4.1 Implantation von Lungengewebe in die Rückenhautkammer	79
4.5 GEWINNUNG VON ENDOMETRIUMGEWEBE.....	81
4.5.1 Implantation des Endometriums.....	83
4.6 SETZEN DER ISCHÄMIE.....	85
4.7 ENDOTHELIALE PROGENITORZELLEN (EPC)	87
4.7.1 Isolation und Kulturbedingungen von endothelialen Progenitorzellen (EPC) aus Ratten-Knochenmark (Kähler et al. 2007)	87
4.7.2 Injektion der EPC.....	90
4.8 APPLIKATION VON SUBKUTANEM MATRIGEL	91
4.9 HISTOLOGIE	91
4.9.1 Histologische Präparate	91
4.9.2 Konventionelle Histologie und Immunhistochemie.....	92
4.9.3 Y-Hybridisierung	92
4.10 STUDIEN.....	93
4.10.1 Charakterisierung der Lunge	93
4.10.2 Vergleich mit Endometrium.....	94
4.10.3 Hypoxie-Hyperoxie-Serien.....	95
4.10.4 Ischämie-Reperfusionsschaden	97
4.10.5 Homing von endothelialen Progenitorzellen	97
5 ERGEBNISSE	98
5.1 MODELLAUFBAU.....	98
5.1.1 Bau der Rückenhautkammer.....	98
5.1.2 Entnahme von Lungengewebe.....	99

5.1.3 Entnahme von Endometriumgewebe	99
5.1.4 Implantation des Gewebes in die Rückenhautkammer	99
5.1.5 Intravitalmikroskopie	100
5.2 CHARAKTERISIERUNG DER LUNGE UND VERGLEICH MIT ENDOMETRIUM	100
5.2.1 Implantation von Lungen- und Endometriumgewebe in die Rückenhautkammer	100
5.2.2 Organfläche	106
5.2.3 Revaskularisierte Fläche	108
5.2.4 Gefäßdurchmesser	110
5.2.5 Flussgeschwindigkeit	111
5.2.6 Funktionelle Kapillardichte	113
5.2.7 Leukozyteninfiltration	114
5.2.8 Apoptose	115
5.2.9 Histologie	116
5.3 HYPOXIE-HYPEROXIE-SERIEN	118
5.4 ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN	119
5.5 HOMING DER ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN	120
6 DISKUSSION	123
6.1 CHARAKTERISIERUNG DER LUNGE UND ENDOMETRIUM	123
6.1.1 Messung der hämodynamischen Parameter	125
6.1.1.1 Organfläche	125
6.1.1.2 Revaskularisierte Fläche	125
6.1.1.3 Gefäßdurchmesser	126
6.1.1.4 Flussgeschwindigkeit	127
6.1.1.5 Funktionelle Kapillardichte	127
6.1.1.6 Anzahl Leukozyten pro Länge Gefäß	128
6.1.1.7 Apoptose	130
6.1.2 Vergleich mit Endometrium	130
6.1.3 Vergleich unseres Versuchsaufbaus mit dem "Animal Model" von Sriramarao et al.	131
6.1.3.1 Versuchsaufbau und äußere Bedingungen	131
6.1.3.2 Intravitalmikroskopie	134
6.1.3.3 Markierung der Erythrozyten	135
6.1.3.4 Benetzung der Lungentransplantate mit ET-1	135
6.1.3.5 Effekt von TNF- α	137
6.1.3.6 Anästhesie	140
6.1.3.7 Anwachsen der Lungenstücke	141
6.1.3.8 Histologien und hämodynamische Parameter	142
6.1.3.9 Deformierung der Leukozyten	144
6.2 HYPOXIE-HYPEROXIE-SERIEN	144

6.3	ISCHÄMIE-REPERFUSIONSSCHADEN	146
6.4	HOMING DER ENDOTHELIALEN PROGENITORZELLEN.....	148
6.4.1	Endotheliale Progenitorzellen allgemein	148
6.4.2	Diskussion unserer Ergebnisse inklusive Histologie	150
7	AKTUELLE STUDIENLAGE UND PERSPEKTIVEN	157
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	163
9	DANKSAGUNG.....	200
10	LEBENS LAUF.....	202

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Bisher gab es nur wenige Möglichkeiten, die pulmonale Gefäßstrombahn *in vivo* direkt zu beobachten. Die direkte intravitalmikroskopische Untersuchung der Lunge gestaltete sich schwierig und eignete sich nicht für wiederholte Untersuchungen über mehrere Tage.

Uns interessierte deshalb, in der Rückenhautkammer der Maus ein Modell mit ektopt transplantiertem Lungengewebe zu entwickeln, dieses zu charakterisieren und in diesem das Homing von endothelialen Vorläuferzellen nach einem akuten Gewebeschaden zu studieren.

Rückenhautkammern eignen sich zur intravitalen Mikroskopie der Mikrozirkulation und zur Analyse der Neovaskularisierung z.B. von Granulationsgewebe oder Gewebeimplantaten.

Entsprechend haben wir C57BL/6-Mäusen eine Rückenhautkammer implantiert und 3 Tage nach Implantation der Rückenhautkammern 3-4 syngene, subpleurale Lungenparenchymwürfel oder je 1-2 autologe Endometrium- und syngene Lungenstücke in die Kammer transplantiert. In den folgenden 14 Tagen führten wir unter Narkose und nach intravenöser Gabe von Fluoreszenzfarbstoffen intravitale Fluoreszenzmikroskopien durch und ermittelten durch computerassistierte Offline-Analyse die hämodynamischen Parameter wie Gefäßdurchmesser und Flussgeschwindigkeiten der Lungen-, Endometrium- und Kammergefäße.

Am Tag 3 nach Transplantation fanden sich erste Zeichen der Neoangiogenese in Form von sinusoidal erweiterten Gefäßschläuchen am Transplantatrand mit sehr langsamem Blutfluss, perifokalem Ödem und einer Einblutungstendenz. Bis zum Tag 10 fand eine vollständige Revaskularisierung des Lungentransplantates durch Anschluss an das Gefäßsystem des Empfängergewebes statt. Diese bestand aus einem zunehmend dichten Netzwerk neu gebildeter Mikrogefäße mit irregulären Durchmessern, einer chaotischen Angio-Architektur und einem deutlich erhöhtem Blutfluss. In den Endometrium-Transplantaten fanden sich dagegen ein deutlich niedrigerer Blutfluss und eine glomerulumartig strukturierte Angio-Architektur. Es schien zu einem Anschluss des pulmonalen Gefäßbettes an die Gefäße der Rückenhautmuskulatur zu kommen.

Zur Überprüfung, ob die Gefäße des ektopten Lungengewebes Eigenschaften der pulmonalen Gefäßstrombahn annehmen bzw. erhalten haben, wurden mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die Durchmesser der Mikrogefäße des Kammergewebes so-

wie der neu gebildeten Gefäße des Transplantates unter verschiedenen inspiratorischen Sauerstofffraktionen untersucht.

Es zeigte sich eine reproduzierbare Vasokonstriktion der Lungenarteriolen unter Hypoxie mit Reversibilität unter Normoxie bzw. Hyperoxie, während die Muskel- und Endometriumarteriolen unter Hypoxie dilatierten und unter Hyperoxie konstringierten. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Lungentransplantate die organspezifischen hypoxisch-vasokonstriktorisches Eigenschaften der pulmonalen Strombahn auch nach Revaskularisierung in der Rückenhautkammer besitzen.

Um einen akuten Lungenschaden zu imitieren, wurden in einer weiteren Versuchsreihe bei Nacktmäusen mit revaskularisiertem Lungengewebe mit einem Druckstempel der Blutfluss zu einem der ektopen Lungenstücke für ein oder zwei Stunden unterbrochen. Der ischämische Schaden konnte charakterisiert werden, indem vor der Schadenssetzung, während der Ischämie, direkt nach der Reperfusion sowie 3 und 24 Stunden nach Reperfusion dieselben Gefäßabschnitte intravital mikroskopiert und der Blutfluss und die Gefäßdurchmesser beurteilt wurden.

In einer letzten Versuchsreihe wurde erneut das Ischämie-Reperusionsmodell an Nacktmäusen verwandt und eine Stunde nach Reperfusion 4×10^6 fluoreszenzmarkierte (SP-DilC₁₈(3)) endotheliale Progenitorzellen teilweise von der Ratte und zum Teil vom Menschen in die Vena jugularis injiziert. Direkt danach, 3 Stunden und 1-14 Tage später wurden die endothelialen Progenitorzellen (EPC) und die Kapillaren der Lungenstücke und der Kammer intravitalmikroskopisch dargestellt.

Der Ischämie-Reperfusionsschaden führte zu einer Schädigung des Gewebes mit Ödem. Die EPC fanden sich 24 Stunden nach Verabreichung hauptsächlich im ektopen Lungengewebe wieder. Dabei befanden sich im geschädigten Lungengewebe signifikant mehr EPC als in den nicht geschädigten Lungenwürfeln.

Aus den gewonnenen Ergebnissen geht hervor, dass das vorliegende *in vivo* Modell zur Transplantation ektopen Lungengewebes dafür geeignet ist, die pulmonale Mikrozirkulation über einen Zeitraum von mehreren Tagen *in vivo* quantitativ zu analysieren. Der deutlich erhöhte Blutfluss im Lungentransplantat im Vergleich zum Mikrogefäßsystem des Hautmuskels des Empfängertieres oder von Endometrium lässt darauf schließen, dass das Gefäßsystem des Transplantats über eine vom Gefäßsystem der Empfänger-muskulatur unabhängige Vasoregulation entsprechend dem metabolischen Bedarf oder der spezifischen Organfunktion verfügt.

Darüber hinaus eignet sich das vorgestellte Modell dafür, intravitalmikroskopisch das Homing von extrakorporal expandierten endothelialen Progenitorzellen zu studieren. Es kann daher zukünftig für weitere Studien zur Charakterisierung des Homing von EPC unter verschiedenen Ausgangssituationen genutzt werden.

1.2 Summary: Transplantation of lung tissue into the skinfold chamber of the mouse: Characterization and homing of endothelial progenitor cells

So far, there have been only a few opportunities to observe the pulmonary vasculature directly *in vivo*. Direct intravital microscopic examination of the lungs turned out to be difficult and was not suitable for repeated investigations over several days.

Therefore, we were interested in developing a skinfold chamber model on the mouse with ectopic transplanted lung tissue, to typify the lung tissue inside the skinfold chamber and to study the homing of endothelial progenitor cells after acute tissue damage with this model.

Dorsal skinfold chambers are suitable for intravital microscopy of the microcirculation and for the analysis of neovascularization as of granulation tissue or tissue implants. Accordingly, we implanted within C57BL/6-mice a dorsal skinfold chamber, and 3 days after implantation of the chamber, we transplanted 3-4 syngeneic subpleural pieces of lung tissue or each 1-2 autologous Endometrium tissues and syngeneic lung tissues in the chamber. In the next 14 days we performed, under anesthesia and after administering intravenous fluorescent dyes, intravital fluorescence microscopy. We determined by computer-assisted offline-analysis the hemodynamic parameters such as vessel diameter and flow velocities of the lung-, the endometrium- and chamber vessels.

On day 3 after transplantation, the first signs of neoangiogenesis were found in form of sinusoidal vascular tubes on the edge of the graft with very slow blood flow, perifocal edema and a tendency to hemorrhage. By day 10 a complete revascularization of the lung transplant took place with a connection to the vascular system of the recipient tissue. This consisted of an increasingly dense network of newly formed microvessels with irregular diameters, a chaotic Angio-Architecture and significantly increased blood flow. The endometrium grafts contained, however, a significantly lower blood flow and a structured glomerulus-like vessel architecture. There seemed to develop a port from the pulmonary vascular bed to the vessels of the skinfold muscles.

To check whether the vessels of the ectopic lung tissue adopted the properties of the pulmonary vasculature, we investigated by intravital fluorescence microscopy the diameters of the microvessels of the tissue chamber and the newly formed vessels of the graft under different inspiratory oxygen fractions.

There was a reproducible vasoconstriction of the arteriolar of the lung tissue throughout hypoxia with reversibility under normoxia or hyperoxia, while the arteriolar of the muscle and the Endometrium tissue dilated during hypoxia and constricted in hyperoxia. The results indicated that the lung grafts keep their organ-specific hypoxic-

vasoconstriction properties of the pulmonary vascular system after revascularization in the dorsal skinfold chamber.

To mimic an acute lung injury, we used another series of experiments in nude mice with revascularized lung tissue and interrupted the blood flow to one of the ectopic lung pieces with a pressure plunger for one hour or two. The ischemic damage was characterized by intravital microscoping the same vessel sections and assessing the blood flow and vessel diameters directly before putting on the ischemia, during ischemia, immediately after reperfusion, and 3 and 24 hours after reperfusion.

In a last series of experiments, we again used our ischemia-reperfusion model in nude mice and injected 4×10^6 fluorescently labeled (SP-DiI C18 (3)) endothelial progenitor cells of the rat or a human into the jugular vein one hour after reperfusion. The endothelial progenitor cells (EPC), the capillaries of the lung tissue and of the chamber could then be shown through intravital microscopy right after injection, 3 hours, and 1-14 days later.

Ischemia-reperfusion injury resulted in damage of the tissue with edema. 24 hours after administration the EPC were mainly found in the ectopic lung tissue. At the same time, there were significantly more EPC located in the damaged lung tissue than in the non-damaged lung cubes.

The obtained results indicate that the present model of *in vivo* transplantation of ectopic lung tissue is suitable for quantitative *in vivo* analyzes of the pulmonary microcirculation over a period of several days. The significantly increased blood flow in the lung transplant as compared to the blood flow of the microvasculature of the skin muscle of the recipient animal or to the blood flow of the endometrium suggests that the vascular system of the graft has a vasoregulation, which is independent from the vascular system of the recipient and seems to be according to the metabolic needs or the specific organ function.

In addition, the proposed model is suitable for intravital microscopy to study the homing of endothelial progenitor cells expanded outside the body. It could, therefore, be used for further studies to characterize the homing of EPC in different situations in the future.

2 Einleitung

2.1 *In-Vivo* Mikroskopie - Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Es existieren zwei Methoden, mit denen man ein *in vivo*-Bild der Mikrozirkulation darstellen kann. Auf der einen Seite gibt es die Transilluminationstechnik, bei der das Untersuchungs-gewebe maximal eine Schichtdicke von 300µm haben kann. Diese Bedingung ist gewährleistet bei Mesenterium (Zweifach, 1954), Omentum (Intaglietta, Tompkins, & Richardson, 1970) und Kremastermuskel (Prewitt & Johnson, 1976a). Auf der anderen Seite besteht die Epi-illuminationstechnik, die aufgrund fluoreszierender Marker und spezifischer Färbungen funktioniert. Diese Methode kann bei soliden Organen, wie Herz (Huwer et al., 1998) und Leber (Menger, Marzi, & Messmer, 1991) angewandt werden.

Inzwischen ist es durch die intravitale Mikroskopie möglich, bei fast allen Organen die Mikrozirkulation und Hämodynamik sichtbar zu machen und zu erforschen. Beispiele dafür stellen Gehirn (Kawamura et al., 1990), Herz (Huwer et al., 2001), Lunge (Schneider, Foitzik, Kahrau, Podufal, & Buhr, 2001), Leber (Vollmar, Siegmund, & Menger, 1998), Milz (McCuskey & McCuskey, 1977), Pankreas (Menger, Bonkhoff, & Vollmar, 1996), Pankreasinseln (Vollmar et al., 1999), Magen (Menger, 1994), Dick- und Dünndarm (Gonzalez, Sepulveda, Massberg, Baumeister, & Menger, 1994; Massberg, Eisenmenger, Enders, Krombach, & Messmer, 1998; Riaz et al., 2002), Harnblase (Bajory, Hutter, Krombach, & Messmer, 2002), Knochen (Albrektsson & Albrektsson, 1978), Periost (Rucker, Roesken, Vollmar, & Menger, 1998), Muskel (Tymel & Budreau, 1991), Subcutis (Rucker, Strobel, Vollmar, Roesken, & Menger, 2000) und Haut (Barker et al., 1989) dar.

Mithilfe dieses Verfahrens ist es möglich, die spezifischen Strukturen der mikrovaskulären Netzwerke mit den Arteriolen, Kapillaren, postkapillären Venolen und den Sammelvenolen zu erforschen. Ferner können mit Hilfe der Intravitalmikroskopie hämodynamische Parameter, wie beispielsweise die Erythrozytengeschwindigkeit, Gefäßdurchmesser, der mikrovaskuläre Blutfluss und die Abscherkräfte an der Gefäßwand gemessen werden. (Menger, Laschke, & Vollmar, 2006). Eine Limitation dieser Methode ist, dass hier lediglich Momentaufnahmen gemacht werden können. Angiogenese stellt aber einen Verlauf dar, der Tage bis hin zu Wochen dauern kann. Um die verschiedenen Entwicklungsstufen der Gefäßbildung *in vivo* zeigen zu können, müsste man folglich mehrfach chirurgisch und damit auch traumatisch eingreifen. Diese Traumata wiederum regen die Inflammation und auch die Angiogenese an (Fiebig, Ley, & Arfors, 1991b;

Thaler et al., 2005; Greene et al., 2005) und beeinflussen auf diese Weise die Untersuchung der angiogenetischen Reize, die mit den verschiedenen Krankheitsstadien auftreten.

Es besteht neben z.B. Konjunktiva, Nasenschleimhaut und Sklera ein ideales Organ, was sich hier anders verhält: Haut ist ohne vorherige Operation erreichbar und kann daher, ohne die angiogenen Stimuli zu beeinflussen, mit diesem Verfahren wiederholt analysiert werden (Barker et al., 1989; Vollmar et al., 1998). Die Schwachstelle an Haut ist jedoch, dass sie für die intravitale Mikroskopie nicht die einwandfreie Transparenz mitbringt und dieselbe von der Pigmentierung und dem Alter abhängt.

Um nun all die genannten Einschränkungen zu umgehen, kann man von dem Rücken-hautkammermodell für die Intravitalmikroskopie Gebrauch machen. Für dieses Modell muss man zwar einmalig die Kammer chirurgisch präparieren, um Subcutis, Muskel und Epidermis zu entfernen, danach ist jedoch lediglich eine Erholungsphase von 48-72 Stunden erforderlich und dann befindet sich die Mikrozirkulation im Normalzustand. Die Rückenhautkammer verkörpert den perfekten durchsichtigen Raum, der immer wieder intravital mikroskopiert werden kann, und kann als Empfängergewebe für Implantationsversuche verwendet werden (Menger et al., 2006).

2.2 *In vivo*-Mikroskopie im Respirationstrakt

2.2.1 Trachea

Die Intravitalmikroskopie ermöglicht es, viele Informationen über die Gefäßreaktionen in den Luftwegen zu gewinnen. Es wurde eine Versuchsreihe entwickelt, bei der die Reaktionen der Mikrogefäße von den Luftwegen auf vasokonstriktorisches und dilatatorische Reize untersucht wurden (Corboz, Ballard, Boyette, & Taylor, 1995; Corboz, Ballard, Inglis, & Taylor, 1996; Corboz, Ballard, Inglis, & Taylor, 1997). In diesem Modell werden die Mikrogefäße der adventitialen Oberfläche der Trachea von narkotisierten Ratten bildgebend dargestellt. Dazu wird einer Ratte in die linke Femoralarterie und -vene ein Katheter gelegt, um den arteriellen Blutdruck und die Blutgase zu messen und die Narkosemedikamente zu verabreichen. Die Ratte wird auf dem Rücken liegend fixiert und die Trachea frei präpariert. Mit der Epi-Illuminationstechnik können die trachealen Blutgefäße unter dem Mikroskop *in situ* demonstriert werden. Das Tier ist dabei beatmet, um die Blutgase im physiologischen Bereich zu halten, und die Körpertemperatur wird konstant auf 37°C gehalten. Als Qualitätsmerkmale der Präparation gelten dabei ein mittlerer arterieller Blutdruck von mindestens 80mmHg, ein Blut pH-Wert von 7.35-7.45 und die Absenz von sichtbaren trachealen Blutungen. Die tracheale Zirkulation vieler Spezies ist durch verschiedene Mucosa- und Adventitia-Plexus be-

stimmt (Widdicombe, 1993a; Widdicombe, 1993b). Die Rattentrachea ist hingegen ausreichend dünn, so dass eine solche Unterteilung nicht besteht (Corboz et al., 1995). Der Vorteil an der Untersuchung von trachealen adventitialen Gefäßen ist der, dass die Trachea nicht reseziert werden muss, was zur Bildung einer Entzündung und eines Ödems führen würde (Nordin, Kallskog, Lindholm, & Wolgast, 1978). Das adventitiale Gefäßnetz der Rattentrachea besitzt nicht die gleiche Organisation wie z.B. Mesenterium, Skelettmuskel und Herz (Corboz et al., 1995). Die Fläche oberhalb der Knorpel ist relativ avaskulär im Gegensatz zu den Knorpelzwischenräumen, die eine sehr hohe Gefäßdichte aufweisen. In diesem Bereich sind Venolen wesentlich häufiger zu finden als Arteriolen. Arteriolen haben einen ungefähren Durchmesser von 10-50 µm und sind charakteristisch für einen schnellen Blutfluss von den großen Gefäßen in die stetig kleiner werdenden Gefäße. Die Venolen jedoch formen ausgedehnte Netzwerke und variieren in der Größe von 10 µm Durchmesser bei den postkapillaren Venolen bis zu 60-100µm Durchmesser bei den Sammelvenen. Venolen können anhand des relativ trägen Blutflusses identifiziert werden, der von den kleinen verzweigten Venolen in die immer größer werdenden Gefäße fließt. Gelegentlich kann man hängende Leukozyten in den Venolen beobachten, jedoch niemals in den Arteriolen.

Sobald ein Gefäß zur genaueren Untersuchung ausgewählt worden ist, wird es über eine Zeitspanne von 20 Minuten beobachtet. Danach können vasokonstriktorische Substanzen hinzugegeben werden, um ihren Effekt auf den Gefäßdurchmesser nach einer ausreichenden Reaktionszeit zu ermitteln. So sieht man eine Durchmesseränderung als Reaktion auf unterschiedliche Konzentrationen des α -adrenergen Rezeptor-Agonisten Norepinephrin in der Gegenwart von Propranolol von 13-27µm bei den trachealen Arteriolen, 35-59µm bei den mittleren Venolen und 61-96µm bei den großen Sammelvenen. Aus diesen Daten können dann Konzentrations-Wirkungs-Kurven der konstriktorischen Effekte von Norepinephrin in der Gegenwart von Propranolol konstruiert werden. Prazosin, ein selektiver α_1 -adrenerger Rezeptor-Antagonist, verursacht eine Rechtsverschiebung in der Kurve.

Dieses System kann ebenfalls für die Evaluierung von Vasodilatoren zu Rate gezogen werden. Um jedoch sicher eine Reaktion messen zu können, ist es in der Regel nötig, zunächst einen Vasokonstriktor wirken zu lassen. Aufgrund der Tatsache, dass α_1 -adrenerge Rezeptoren keine Vasokonstriktion bei Gefäßen mit einem Durchmesser unter 25µm vermitteln (Corboz et al., 1995), ist Phenylephrin als effektive Präkonstriktor Substanz vorzuziehen.

Mit diesem Versuchsprotokoll kann die Verteilung von funktionalen adrenergen Rezeptor-Subtypen in der trachealen Mikrozirkulation von Ratten ausgemacht werden (Corboz et al., 1995; Corboz et al., 1996). A_1 -adrenerge Rezeptoren verursachen eine

Vasokonstriktion an allen Gefäßen, außer an den kleinen Venolen, wo sich vermutlich α_2 -adrenerge Rezeptoren befinden. Außerdem kann beobachtet werden, dass β_1 -adrenerge Rezeptoren hauptsächlich in den Sammelvenen und β_2 -adrenerge Rezeptoren überwiegend in Arteriolen vorkommen (Corboz et al., 1996). Beide dieser Rezeptor-Subtypen vermitteln eine Dilatation der Gefäße. Aus Studien ist ersichtlich, dass basal freigesetztes Stickstoffoxid einen beträchtlichen vasodilatatorischen Einfluss auf tracheale Mikrogefäße hat (Smith, Prazma, Coleman, Drake, & Boucher, 1993; Corboz et al., 1997).

Mit dieser beschriebenen Untersuchungstechnik ist es möglich, die Aktionen an den Gefäßen genau zu lokalisieren, im Gegensatz zu vorhergehenden Studien, die sich auf das Messen von Druck und Fluss in großen Tracheal- und Bronchialarterien beschränkten. Weiterhin könnte man mit dieser Technik die Kinetik der Leukozyten und deren Rolle bei der Inflammation der Luftwege studieren.

Ein Kritikpunkt an dieser Technik ist der operative Vorgang, der nötig ist, um die Trachea frei zu legen, was dazu führt, dass Neuropeptide wie Substanz P und Calcitonin gene-related Peptid frei gesetzt werden (Salonen, Webber, & Widdicombe, 1988). Diese Substanzen sind entzündungsfördernd, rufen eine Vasodilatation und eine Zunahme der Gefäßpermeabilität in den Luftwegen hervor (McDonald, 1988).

Grundsätzlich ist die hier beschriebene Technik folglich sowohl zur Untersuchung der *in vivo* Aktivität von Vasodilatoren und Vasokonstriktoren als auch zur Messung von mikrovaskulärem Blutdruck geeignet.

2.2.2 *In-situ* - Lungengewebe

Es liegt eine Studie vor, die ein neues Modell zur intravitalen Mikroskopie der Lungenmikrozirkulation bei geschlossenem Thorax *in situ* zeigt (Tabuchi, Mertens, Kuppe, Pries, & Kuebler, 2008). Hierbei ein rundes Fenster in der rechten Brustwand in BALB/c-Mäusen präpariert, das mit einer transparenten Polyvinyl-Membran und α -Cyanacrylat dicht verschlossen wurde. Die intrathorakale Luft wurde entfernt und der physiologische intrapleurale Unterdruck von -5mmHg rekonstruiert. Mit der Epilluminationstechnik konnten die mit FITC dargestellten Gefäße sichtbar gemacht, aufgenommen und später offline ausgewertet werden. In jedem Fenster waren 4-5 Arteriolen und 2-3 Venolen sichtbar. Als Antwort auf eine 10 minütige Hypoxie konstringierten sich die mittelgroßen Arteriolen um ca. 6%, während die kleinen Arteriolen und Venolen eine geringere oder keine Konstriktion zeigten.

Bei einer weiteren Studie wurden an anästhesierten Kaninchen intakte parietale pleurale Fenster eingesetzt. Zunächst wurde dazu eine Tracheotomie mit Einführung einer Trachealkanüle durchgeführt, die das spontane Atmen und Ventilation bei Bedarf er-

leichterte. Während der gesamten chirurgischen Präparation atmete das Tier spontan. Vor der Mikropunktion wurde die spontane Beatmung durch Paralyse unterbrochen. Es wurde durch die intakte parietale und viscerale Pleura hindurch mikropunktiert, was eine nichtinvasive Art darstellt, den hydraulischen Druck in den oberflächlichen Lungenmikrogefäßen und dem Interstitium mit minimaler Verzerrung zu messen. Diese Methode verhinderte das Öffnen der Pleuraräume und die Re-Expansion der kollabierten Lunge bei positivem Alveolardruck. Durch die Besonderheit bei Kaninchen, bei denen die Pleuraräume anatomisch separiert sind, erlaubt die Präparation des intakten Pleurafensters eine Mikropunktion des Interstitiums und den Mikrogefäßen unter Intaktlassen der Lungen-Brust-Wand. Die beiden Lungen sind in eigenständigen Pleurasäcken, wodurch es möglich ist, das Herz zu erreichen, die Pulmonalvene und das linke Atrium zu katheterisieren ohne dass die Lungen kollabieren. Ein Katheter in der Carotisarterie war ein Zugang für weitere Anästhetika, zur Blutgewinnung für arterielle Blutgasanalysen und zur kontinuierlichen Messung des arteriellen Blutdrucks. Ein weiterer Katheter in der Jugularvene diente dem kontinuierlichen Messen des zentralen Venendrucks sowie dem Zufügen von Infusionsflüssigkeiten und Medikamenten. Zur Präparation des Lungenfensters wurden die Interkostalmuskeln auf einer Seite der Brust entfernt und das Pleuralfenster durch ein Stereomikroskop hergestellt. Die endothorakale Faszie wurde ca. $0.2-0.3\text{cm}^2$ groß ausgeschnitten, wobei nur die sehr dünne parietale Pleura intakt blieb. Diese Pleura war so transparent, dass sie eine klare Sicht auf die anatomischen Strukturen der Lungenoberfläche zuließ. Diese finale Phase erforderte viele Konzentration, um eine Ruptur des sehr dünnen Mesothels zu verhindern, die zu einem Pneumothorax geführt hätte. In einen Interkostalraum konnten 2-3 Fenster platziert werden. Die Dicke des parietalen und visceralen Mesothels und der Pleuraflüssigkeit machten es unmöglich, Arteriolen und Venolen anhand ihrer Blutflussrichtung zu identifizieren. Durch Injektion von Färbeflüssigkeit (0.5ml Lissamingrün oder Evansblau) in die Pulmonalarterie erkannte man Arteriolen dadurch, dass der Farbstoff von den größeren in die kleineren Gefäße floss, und Venolen daran, dass der Farbstoff von den kleineren zu den größeren Gefäßen floss (Negrini D., 1998).

Die Mikropunktionstechnik hat zum Ziel, neue Einsichten in die Mechanismen der Filtration und Absorption von Flüssigkeit in diesen komplexen interstitiellen Systemen zu erlangen. Die Fensterpräparation erlaubt, den interstitiellen Lungendruck von physiologischen Konditionen bis hin zum Lungenödem zu messen (Miserocchi, Negrini, Del Fabbro, & Venturoli, 1993; Negrini, Passi, de Luca, & Miserocchi, 1996). Das hier beschriebene Pleuralfenster stellt eine Verbesserung in der Lungenforschung dar, da hier zum ersten Mal der Lungenflüssigkeitsaustausch zwischen den Mikrogefäßen und dem

umgebenden interstitiellen Raum in physiologischen Bedingungen beschrieben wird (Negrini D., 1998).

2.2.3 Ektopes Lungengewebe

Zuerst waren die Leukozyteninteraktionen nur in der systemischen Blutzirkulation genau bekannt, jedoch nicht in der Lungenzirkulation. Man wusste sehr wenig über die Mechanismen der Leukozyten-Endothel-Interaktionen in entzündeten Blutgefäßen der Lungenzirkulation. Bisherige Betrachtungen durch das Mikroskop von den Leukozyten-Endothel-Interaktionen waren durch die rhythmischen Bewegungen der Lunge während der kardiorespiratorischen Zyklen sehr erschwert. Bis dahin war das thorakale Fenster das einzige Modell, um die Lungengefäße bildlich darzustellen (Sikora et al., 2003). Ein Rückenhautkammermodell der Maus beschäftigte sich mit den Leukozytenaktionen innerhalb der Lungengefäße, wobei man die Leukozyten in den revaskularisierten Lungengefäßen durch die Intravitalmikroskopie beobachten konnte (Sikora et al., 2003). Zum Kammerbau wurden dazu Titanrahmen auf die Rückenhaut implantiert, die wie in einem Sandwich dazwischen lag. Eine Hautschicht wurde rund mit einem Durchmesser von 15mm ausgeschnitten. Der nun frei liegende Hautmuskel auf der Subcutanhaut und der Epidermis wurde mit einem Plexiglas abgedeckt, das eingeschlossen im Titanrahmen lag. Die Mäuse hatten dann 2-3 Tage zur Regeneration, bis das Deckglas abgenommen wurde, um bis zu drei Lungenallografte vorsichtig auf die oberste Gewebeschicht zu platzieren. Für das Lungengewebe wurden BALC/c-Mäuse als Spender verwendet. Die Lungenstücke waren Gewebswürfel aus der Peripherie der Lunge und wurden für 30 Minuten in sterile Hank's Pufferlösung mit 5-(und 6)-(((4-Chloromethyl)benzoyl)amino) Tetramethylrhodamine 1mg/ml, so dass sie für 2-3 Tage fluoreszierend waren (Sikora et al., 2003). Die Lungengewebestücke in der Rückenhautkammer wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen regelmäßig intravital mikroskopiert, wozu die Mäuse in einem Plexiglasröhrchen fixiert wurden und FITC-Dextran i.v. injiziert bekamen, was zur Darstellung der Gefäße nötig war. 9-14 Tage nach der Lungentransplantation wurde den Mäusen das Deckglas kurzzeitig entfernt und auf die Lungenallografte Endothelin-1 geträufelt, um den vasokonstriktorischen Effekt auf die Gefäße zu messen. Anderen Mäusen wurde ebenfalls an Tag 9-14 die Lungentransplantate mit TNF- α beträufelt, um die Reaktion auf die Leukozyten-Endothel-Interaktionen zu untersuchen (Sikora et al., 2003). An Tag 14 nach der Lungentransplantation wurden Gewebeschnitte sowohl aus den Lungenallograften als auch aus der Rückenhautkammer geschnitten und in 10% Formalin über Nacht fixiert. Repräsentative Lungenschnitte wurden in Paraffin eingebettet und zu 3-5 μ m dicken Schnitten ver-

arbeitet. Mit Hilfe von HE-Färbung konnte die Lungenzellarchitektur sichtbar gemacht und die verschiedenen Strukturen identifiziert werden (Sikora et al., 2003).

Die intravital mikroskopierten Bilder wurden auf VHS-Kassetten gespeichert und offline ausgewertet. An dem Tag, an dem die Lungenstücke in die Rückenhautkammer transplantiert wurden, sprich Tag 0, waren die Stücke als glatt begrenzte Stücke sichtbar und es war kein vaskuläres Netzwerk vorhanden. Von Tag 1-3 war kein Blutfluss feststellbar, der Farbstoff war lediglich in den Gefäßen des Empfängergewebes am Fluoreszieren, was einen normalen Blutfluss indizierte. Tag 4-6 zeigte sich ein stärker werdender Blutfluss, wobei ca. 50% der Lungenallografte bereits revaskularisiert waren. Bis Tag 9 zeigte sich, dass alle Gefäße revaskularisiert waren, ohne dass dabei Thrombosen in den Gefäßen zu sehen waren. Anhand der Blutflussrichtung war deutlich zu erkennen, dass das revaskularisierte Gefäßnetz aus verschiedenen Arteriolen, Kapillaren und postkapillaren Venolen bestand. Durch Verbindungen mit den Empfängergefäßen sicherte das Lungenallograft seinen Blutfluss. Bereits an Tag 3 war zu sehen, wie sich die peripheren Blutgefäße des Lungenstückes in das Empfängergewebe ausstreckten (Sikora et al., 2003).

Bei den histologischen HE-Schnitten von Tag 14 waren Strukturen eines typischen Lungengewebes auszumachen. Im Gegensatz zu herkömmlichem Kammergewebe war das Lungengewebe dadurch charakterisiert, dass neben einer Pulmonalarterie Bronchi mit bronchoepithelialen Zellen und herausragenden Zilien zu sehen waren. Es ergab sich ein klares Muster der arteriellen und venösen Blutversorgung (Sikora et al., 2003). Der durchschnittliche Arteriolendurchmesser war $22.7 \pm 7.8 \mu\text{m}$, während er bei Venolen $26.4 \pm 13.1 \mu\text{m}$ betrug. FITC-markierte Erythrozyten, die in die Schwanzvene appliziert wurden, flossen durch das gesamte Gefäßnetzwerk, ohne an irgendeiner Stelle auszutreten. Das Lungenallograft reagierte auf externe Stimuli. So führte ET-1 zu einer sofortigen signifikanten Vasokonstriktion aller Blutgefäße (Sikora et al., 2003). Dieser Effekt hielt für 45 Minuten an. Die Stimulation des Lungengewebes mit TNF- α führte zu einer signifikanten Zunahme von Leukozyten-Rolling und Adhäsion in den Venolen, verglichen mit der Kontrollflüssigkeit. Ohne die Zugabe von Zytokin-Stimulatoren wurden nur vereinzelte Leukozyten gesehen, die entweder Rollers waren oder sich an die Gefäßwand anhefteten. Innerhalb der Lungenkapillaren waren die Leukozyten deformiert, innerhalb der Arteriolen jedoch nicht. Daher ist davon auszugehen, dass die Leukozyten sich erst beim Übertritt von den Arteriolen in das kapillare Gefäßbett deformierten. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Leukozyten sich aufgrund ihrer zu mächtigen Größe im Vergleich zum Durchmesser der Kapillaren lang strecken (Doerschuk, Beyers, Coxson, Wiggs, & Hogg, 1993). Ihre Möglichkeit der Deformierung bewahrt die Leukozyten davor, in dem

kapillaren Gefäßbett hängen zu bleiben (Hanger, Wagner, Jr., Janke, Lloyd, Jr., & Capen, 1993).

Das hier beschriebene Modell hat im Gegensatz zum Thoraxfenster im Kaninchen einige Vorteile. So besteht zum Beispiel die Möglichkeit, die Leukozyten in der Lungenzirkulation direkt und repetitiv beobachten zu können, was nicht durch die respiratorischen Bewegungen der Lunge limitiert wird. Ein Nachteil an dem Modell ist, dass die Lungenallografte hier stets oxygeniertes Blut unter dem Systemdruck bekommen und nicht wie in der normalen Lunge von der Pulmonalarterie im Niederdrucksystem gespeist werden.

2.3 Rückenhautkammermodelle: Eine kurze Übersicht

Das Rückenhautkammermodell hat in den letzten Jahren viele Veränderungen durchlaufen. Es hat sich als ein sehr nützliches Modell zur Analyse der Mikrozirkulation sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen durchgesetzt. Durch die Präparation der Rückenhautkammer liegen die terminalen Arteriolen, Kapillaren, postkapillaren Venolen und Sammelvenolen gut sichtbar auf dem quergestreiften Skelettmuskel frei. Durch intravitale Fluoreszenzmikroskopie kann dann die gesamte Mikrozirkulation bildlich dargestellt werden und ihre mikrodynamischen Parameter können quantitativ ausgewertet werden. Diese Resultate sind mit denen aus anderen Mikrozirkulationsmodellen vergleichbar (Burton & Johnson, 1972; Endrich, Asaishi, Gotz, & Messmer, 1980).

In den letzten Jahrzehnten wurden zur *in vivo*-Analyse der Mikrozirkulation hauptsächlich „Akut-Modelle“ genutzt. Diese wurden am Mesenterium (Zweifach, 1954; Zweifach, 1973), am Omentum (Intaglietta et al., 1970) der Katze, am Cremastermuskel der Ratte (Prewitt & Johnson, 1976b) oder an der Backentasche des Hamsters (Duling, 1973) verwendet. Der Vorteil an dieser Technik ist, dass diese Gewebe zur intravital-mikroskopischen Untersuchung leicht zugänglich sind und transilluminierbar sind. Auf diese Weise ist die Analyse der Hämodynamik leicht durchführbar. Der Nachteil allerdings ist das frische chirurgische Trauma, das aber eine notwendige Grundlage für solch eine akute Präparation ist (Fiebig, Ley, & Arfors, 1991a). Eine weitere Beeinträchtigung ist die sehr kurze und einmalige Beobachtungszeit von wenigen Stunden. Durch die Entwicklung der Rückenhautkammer entstand ein chronisches Mikrozirkulationsmodell, mit dem wiederholte Messungen ohne großes chirurgisches Trauma möglich wurden. Nach der Präparation der Kammer hat das Versuchstier 2-3 Tage Zeit zur Erholung, bis das Transplantat durch kurzzeitiges Entfernen des Deckglases in die Kammer implantiert wird. Danach kann die Mikrozirkulation ohne weiteres Trauma an verschiedenen Untersuchungstagen analysiert werden.

Das erste Modell mit einer transparenten Kammer wurde von Sandison 1924 an einem Kaninchenohr entwickelt, mit dem erstmalig eine längerfristige intravitalmikroskopische Untersuchung von Gewebewachstum möglich war (Sandison J.C., 1924; Sandison J.C., 1928). Dieses Modell wurde dann in den darauf folgenden Jahren stetig modifiziert, um die Implantation zu vereinfachen und die Bildqualität zu verbessern (Clark E.R., Kirby-Smith H.A.T, Rex R.O., & Williams R.G., 1930; Arfors, Jonsson, & McKenzie, 1970). Ein großer Nachteil an diesem primären Modell war, dass das untersuchte Gewebe hauptsächlich aus Granulationsgewebe mit ausgebildeter Neovaskularisation bestand, das im Rahmen des Wundheilungsprozesses entstand. Die Analyse der Mikrozirkulation war daher mit diesem ersten Modell nicht möglich. Ziel der Weiterentwicklung des Kammermodells sollte es daher sein, ein natürlich vorkommendes Körpergewebe zu verwenden, dessen Gefäße nicht durch die Implantation oder durch das Kammermaterial an sich beeinträchtigt wird. Dieses Endziel konnte mit den Präparationen von subcutanem Gewebe nach Yamura et al. (Yamura, Suzuki, & Sato, 1971) 1971 und Papenfuss et al. 1979 (Papenfuss, Gross, Intaglietta, & Treese, 1979) an der Rückenhautfalte von Ratten neu erreicht werden. Eine Rückenhautkammer mit Darstellung des Musculus cutaneus maximus zur Analyse des mikrovaskulären Netzwerkes wurde an Ratten (Hobbs, Chusilp, Hua, Kincaid-Smith, & McIver, 1976), Hamstern (Endrich et al., 1980) und Mäusen (Lehr, Leunig, Menger, Nolte, & Messmer, 1993) verwendet. Diese Kammern konnten über einen Zeitraum von 3-4 Wochen intravital mikroskopiert werden, ohne dass sich Granulationsgewebe bildete oder Angiogenese produziert wurde (Lehr, 1993).

Durch kurzzeitiges Entfernen des Deckglases der Rückenhautkammer konnten in die Kammer unterschiedliche Gewebearten leicht implantiert werden und deren Neovaskularisierung untersucht werden. Demzufolge eignet sich dieses Modell speziell auch für Studien zur Angiogenese (Asaishi, Endrich, Gotz, & Messmer, 1981; Endrich, Hammersen, Gotz, & Messmer, 1982; Reinhold & Endrich, 1986). Dies spielt besonders auf dem Gebiet der Tumorforschung eine wichtige Rolle, da hier insbesondere die Mechanismen, die zur Neovaskularisation führen, von Interesse sind. Denn Tumorwachstum und Metastasierung sind nur dann möglich, wenn eine hinreichende Blutversorgung zur Verfügung steht (Folkman, 1990; Macchiarini, Fontanini, Hardin, Squartini, & Angeletti, 1992; Weidner, Semple, Welch, & Folkman, 1991; Weidner, Carroll, Flax, Blumenfeld, & Folkman, 1993). Demgemäß stützen sich neue Behandlungsstrategien in der Tumorthherapie auf anti-angiogenetische Mechanismen (Abels, Szeimies, Steinbach, Richert, & Goetz, 1997; Ma, Lou, Zhang, & Xu, 2000; Zhang, Volpert, Shi, & Bouck, 2000; Liu et al., 2001; Pahernik, Langer, Botzlar, Dellian, & Goetz, 2001).

2.4 Angiogenese und Vaskulogenese: Definitionen, Bedeutung beim erwachsenen Tier

Eine wesentliche Voraussetzung für die Entstehung und das Wachstum von Gewebe ist die Angiogenese, die Bildung von neuen Blutgefäßen aus bereits existenten Gefäßen (FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1987). Dabei proliferieren die Endothelzellen und migrieren zum angiogenetischen Stimulus hin. Sie differenzieren sich und bilden mikrozirkulatorische Gefäßnetzwerke aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen (Hudlicka O., 1984). Im ausgereiften Gewebe spielt die Angiogenese für viele pathologische Vorgänge wie Tumorwachstum (Folkman, 1985; Folkman, 1995b), Wundheilung (Polverini, Cotran, Gimbrone, Jr., & Unanue, 1977; Greenburg & Hunt, 1978; Banda, Knighton, Hunt, & Werb, 1982; Dvorak, 1986) und Entzündung (Jones et al., 1999) eine wichtige Rolle. Dagegen ist die Angiogenese in gesundem Gewebe des Erwachsenen sehr selten, weswegen man den Zellen des Gefäßendothels eine niedrige Mitoserate zuschreibt (Denekamp J., 1984; Hudlicka O., 1984).

2.4.1 Definitionen

Die heute übliche Terminologie der Angiogenese teilt in Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese ein.

Vaskulogenese bedeutet die *de novo*-Gefäßbildung (Pardanaud, Altmann, Kitos, Dieterlen-Lievre, & Buck, 1987; Risau & Flamme, 1995; Poole & Coffin, 1989), während Angiogenese für die Bildung von neuen Blutgefäßen aus zuvor bestehenden Gefäßen steht. Es nimmt im Erwachsenenleben eine wichtige Rolle ein und fungiert als Reparaturmechanismus von geschädigtem Gewebe. Unter Arteriogenese versteht man die Entstehung eines natürlichen Bypass nach einer Stenose. Dabei proliferieren Arteriolen hinzu Arterien. Der Vorgang wird durch Dilatation des Gefäßlumens, die Anlagerung von Myozyten und Hypertrophie des Gefäßendothels ermöglicht (Martin, Wiggs, Lee, & Hogg, 1987a; Scholz, Cai, & Schaper, 2001).

Bereits während der Embryogenese existiert ein Gefäßplexus, der den Embryo mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. An diesen Gefäßen vollziehen sich die Abläufe der Angiogenese: Das Endothel proliferiert, sprosst aus und stülpt sich ein. Bis vor einigen Jahren war man der Überzeugung, dass beim Erwachsenen die Angiogenese von ausdifferenzierten Zellen ausgeht. Aktuelle Studien legen jedoch nahe, dass auch während der adulten Angiogenese endotheliale Vorläuferzellen, Mesangioblasten oder multipotente, adulte Hämangioblasten eine Rolle spielen (Carmeliet, 2003).

Die Angiogenese wird durch metabolische Nachfrage und mechanische Belastungen (z.B. Stress durch Scherkräfte) gesteuert. Die Vaskulogenese hingegen entsteht zu einer Zeit, in der der Embryo noch durch Diffusion ausreichend versorgt werden kann

(Folkman & Shing, 1992; Risau, 1997). Es handelt sich bei der Vaskulogenese um einmalige Stoffwechselvorgänge.

2.4.2 Angioblasten

Angioblasten migrieren viel und sind invasive „prävasculäre“ endotheliale Zellen, die die Form mesenchymaler Zellen haben (Noden D.M., 1991). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Vaskularisierung des Kopfmesenchyms (Noden D.M., 1991), bei angiogenetischen Prozessen des embryonalen ZNS (Kurz, Gartner, Eggli, & Christ, 1996), der Extremitäten (Feinberg & Noden, 1991) und des Koronarplexus des Herzens (Bogers, Gittenberger-de Groot, Poelmann, Peault, & Huysmans, 1989; Mikawa & Fischman, 1992). Angioblasten sind pluripotente Zellen, das heißt sie können zu unterschiedlichem Gewebe differenzieren, z. B. zu Endocard und extraembryonalen Gefäßen (Coffin & Poole, 1991). Bisher konnte nicht mit Sicherheit bestimmt werden, ob Angioblasten nur in der Embryogenese oder auch noch im Erwachsenenalter entstehen.

Während der Embryonalentwicklung beginnt die Vaskulogenese mit der Bildung von Blutinseln aus dem extraembryonalen Mesoderm des Dottersackes. Blutinseln sind Ansammlungen von Epitheloidzellen, wobei sich die Äußeren zu Angioblasten und die Inneren zu primitiven Zellen der Hämatopoese weiter entwickeln. Aufgrund der Tatsache, dass sich sowohl Blutzellen als auch Endothelzellen aus den Blutinseln entwickeln, wird vermutet, dass sie von einer gemeinsamen Population embryonaler Vorläuferzellen, den Hämangioblasten, entstammen (His W., 1900; Murray, 1932; Sabin F.R., 1917). Die Tatsache, dass Endothelzellen, und zumindest ein Teil der hämatopoetischen Zellen, eine Menge gleicher Oberflächenstrukturen haben, erhärtet diesen Verdacht (Baumhueter, Dybdal, Kyle, & Lasky, 1994; DeLisser, Newman, & Albelda, 1994; Kabrun et al., 1997; Labastie, Poole, Peault, & Le Douarin, 1986; McGann, Silver, Liesveld, & Palis, 1997; McNagny et al., 1997; Pardanaud et al., 1987; Wood, May, Healy, Enver, & Morriss-Kay, 1997; Yano et al., 1997).

Der extraembryonale Gefäßplexus wird durch ein Zusammenwachsen von Angioblasten benachbarter Blutinseln gebildet. Die Angioblasten sind dabei an der intestinalen Pforte und an den Außenkanten der Somiten, wo sich die Herzscläuche bilden und zur dorsalen Aorta und den großen Gefäßen der Körpers entwickeln (Coffin et al., 1991). Anders als die extraembryonalen Angioblasten stammen die intraembryonalen Zellen aus dem Mesoderm und werden nicht von hämatopoetischen Zellen begleitet (Dieterlen-Lievre, 1987).

Angioblasten sind im Embryo sehr zahlreich vertreten. In nur wenigen Geweben wie zum Beispiel Knorpel und Epithel kommen sie nicht vor (Noden D.M., 1991; Pardanaud

et al., 1987). Die Organe, die aus dem Endoderm entsprungen sind, haben ein autochthones Kontingent an Angioblasten, wohingegen die Organe, die aus dem somatopleuralem Mesenchym kommen, wie zum Beispiel die Extremitäten, mit den Angioblasten aus dem Rumpf versorgt werden (Pardanaud & Dieterlen-Lievre, 1995). Man vermutet, dass dies an einem Mangel an Angioblasten im somatopleuralem Mesoderm liegt. Es ist weiterhin unklar, ob die Angioblasten schon vor der Entstehung des jeweiligen Organs im Mesoderm vorhanden sind oder sich auch später noch aus pluripotenten Mesenchymzellen entwickeln können.

Risau nahm 1995 an, dass die Angioblasten, sobald sie in ein Gefäß eingebaut werden, temporär ihre migratorischen Eigenschaften verlieren und zu den eher „sesshaften“ Endothelzellen differenzieren. Er war der Meinung, dass, wenn Angiogenese stimuliert werde, dieser Vorgang reversibel sei. Die Angioblasten würden sich von der Gefäßwand trennen und einen neuen Gefäßspross bilden oder zurück ins Gewebe migrieren.

Über die Unterschiede zwischen angiogenetischen und vaskulogenetischen Angioblasten ist noch Vieles unsicher. Risau vermutete 1995, dass die Differenzierungsfähigkeit der Endothelzellen mit dem Alter nachlasse (Risau, 1995).

2.4.3 Tumor Angiogenese

Mithilfe der modifizierten Rückenhautkammer konnten bisher bei ganz verschiedenen Tumoren, wie zum Beispiel beim Melanom (Endrich et al., 1980), Adenocarcinom des Kolon (Leunig et al., 1992), Rhabdomyosarkom (Borgstrom, Hillan, Sriramaraao, & Ferrara, 1996), Nierenzellcarcinom (Heuser, Ringert, Zoeller, & Hemmerlein, 2003), Pankreastumor (Guba et al., 2005) und beim hochgradigen Gliom (Vajkoczy, Schilling, Ullrich, Schmiedek, & Menger, 1998) die Angiogenese und die Vaskularisation untersucht werden (Menger et al., 2006).

Bei stark vaskularisierten Tumoren in der Rückenhautkammer der Maus beobachtet man an Tag 2-4 nach Zellimplantation erste Anzeichen der Angiogenese, wie z. B. Dilatation der Gefäße und verschlungene Verlängerungen der Kammergefäße mit aussprossenden Mikrogefäßen (Vajkoczy et al., 1998; Vajkoczy et al., 1999). Die neu entstandenen Mikrogefäße verzweigen sich miteinander und formen so komplexe Gefäßnetzwerke. Die Mikrogefäße sind im Durchmesser sehr heterogen und haben eine chaotische Netzwerkstruktur (Leunig et al., 1992), sind jedoch von Anfang an mit Erythrozyten perfundiert. Bis Tag 10 ist die Tumormasse komplett vaskularisiert und beginnt von nun an stetig zu wachsen (Vajkoczy, Ullrich, & Menger, 2000). Während der Größenzunahme in der zweiten bis dritten Woche verändert sich die Mikrovaskulatur durch eine hohe angiogenetische Aktivität in der Peripherie des Tumors und eine

niedrige Aktivität im Zentrum des Tumors (Vajkoczy et al., 1998; Vajkoczy et al., 1999). Der Vorgang der Tumorangiogenese besteht aus drei Phasen: Erstens der avaskulären Phase (Tag 0-6), die durch eine initiale Tumorangiogenese, ausgehend von den Kammergefäßen, charakterisiert ist; zweitens der frühen Phase der Tumorevaskularisation (Tag 6-14) mit Entwicklung der Tumormikrozirkulation und folglich dem Beginn des Tumorstadiums; drittens der fortgeschrittenen Phase der Tumorevaskularisation (Tag 14-22), mit beibehaltener hoher peritumorale angiogenetischer Aktivität, aber mikrovaskulärem Umgestalten innerhalb des voll entwickelten Tumors (Vajkoczy et al., 2000).

Durch das Bestimmen der Mikrogefäßdichte, die die Länge der neu gebildeten Gefäße pro Tumoroberfläche verkörpert, kann die Tumorevaskularisation quantifiziert werden (Leunig et al., 1992). Aufgrund der Tatsache, dass nicht alle von den neu gebildeten Gefäßen mit Erythrozyten perfundiert sind, und weil es wichtig ist, mehr über den nutritiven Blutfluss und Tumormetabolismus zu erfahren, bestimmt man außerdem die funktionale Kapillardichte. Diese stellt die Länge der perfundierten Blutgefäße pro Tumoroberfläche dar (Vajkoczy et al., 2000). Der Vorteil an der Kammertechnik in Kombination mit der intravital mikroskopischen Analyse besteht darin, dass sowohl Angiogenese als auch Mikrozirkulation über eine Zeitspanne untersucht werden können. Dies ist von besonderem Interesse, da die Mikrozirkulation im starken Ausmaß die Tumoroxygenierung, den Metabolismus (Helmlinger, Yuan, Dellian, & Jain, 1997; Alexandrakis et al., 2004), die Medikamentenzufuhr (Jain, 1998), die Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen (Vajkoczy et al., 2002) und die Immunzellinvasion (Melder et al., 1996) beeinflusst. Ferner kann außer der Angiogenese (Jain, 2001), die Mikrozirkulation als zusätzliche Zielscheibe für therapeutische Tumordestruktion benutzt werden, wie dies durch die mikrovaskuläre Thrombusbildung in Pankreastumoren nach mTOR-Inhibitor-Behandlung gezeigt werden konnte (Guba et al., 2005).

2.4.4 Angiogenese In Endometriose

Man geht davon aus, dass Angiogenese für die Entwicklung und Progression der Endometriose ein wichtiger Faktor ist. Über diesen Mechanismus weiß man bisher nur sehr wenig. Endometriose kann durch das Implantieren von Endometrium in die Rückenmarkshöhle simuliert werden, wodurch eine quantitative Analyse der Angiogenese und Neovaskularisation mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht wird (Laschke, Elitzsch, Vollmar, & Menger, 2005). Diese Studien zeigen, dass die kombinierte Inhibition von vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor und platelet derived growth factor wirkungsvoll die Angiogenese und die Gefäßreifung der Endometriose unterdrücken. Die alleinige Inhibition von VEGF führt nicht zu

diesem Ergebnis (Laschke, Elitzsch, Vollmar, Vajkoczy, & Menger, 2006). Mithilfe dieses Modells können eventuell weiterführende Studien imstande sein, die Effekte von anderen anti-angiogenetischen Medikamenten auf die Bildung neuer Gefäße zu erläutern (Menger et al., 2006).

2.4.5 Angiogenese in Ischämie und Hypoxie

Man vermutet, dass bei der chronischen Ischämie Angiogenese der einzige Ausweg aus dem hypoxischen Zustand ist. Um die Konditionen einer chronischen Ischämie innerhalb der Rückenhautkammer zu mimen, können die zuführenden Arteriolen legiert werden (Menger, Hammersen, Barker, Feifel, & Messmer, 1988). Diese Prozedur ist jedoch sehr komplex, da innerhalb des subkutanen Gewebes multiple Kollateralverbindungen sind. Bei einer Modifikation dieser Technik (Harder, Amon, Erni, & Menger, 2004) wird im Kammermodell der Maus ein vaskularisierter gestielter Gewebelappen benutzt, der am distalen Teil aufgrund eines Mangels an nutritiven Blutfluss nekrotisch wird. Um den Lappen anzuheben, müssen sowohl die A. iliaca als auch die A. thoracica lateralis durchtrennt werden. Nachdem das angehobene Gewebe bis zur Rückseite des hinteren Teils vom Titaniumrahmen gespannt ist, werden die Seitenteile des Gewebelappens mit dem umgebenden Gewebe innerhalb der Kammer vernäht. Die chronische Ischämie ruft in erster Linie keine angiogenetische Reaktion hervor, um eine Manifestation der Nekrose zu verhindern. Stattdessen entsteht distal von einer hyperämischen Zone eine nicht-vaskularisierte Zone, die das nekrotische Gewebe abgrenzt und möglicherweise noch zu retten ist (Harder et al., 2005a). Weiteres Konditionieren des ischämischen Gewebes verhindert das Entstehen einer Nekrose (Harder et al., 2005b). Dieses wird weder durch Angiogenese und das Entsprießen neuer Gefäße, noch durch Steigern der ischämischen Toleranz des Gewebes erreicht, sondern durch Steigern der nutritiven Mikrozirkulation in der vorbestehenden Mikrovaskulatur (Harder et al., 2005b). Weiterführende Studien müssen aufklären, ob das Fehlen von Angiogenese aufgrund eines Mangels an Wachstumsfaktor auftritt, und ob dies durch Transplantieren von genetisch modifizierten Zellen, die VEGF, Fibroblastenwachstumsfaktor und plateled derived growth factor freisetzen, überwunden werden kann (Menger et al., 2006).

2.4.6 Angiogenese in Transplantation

Viele der Organe wie z. B. Herz, Lunge, Leber, Pankreas und Niere werden, nachdem sie transplantiert sind und die wichtigsten zuführenden Blutgefäße mit Nähten anastomosiert sind, direkt revaskularisiert („primär vaskularisierte Transplantate“). Anders ist dies bei Organen wie Nebenschilddrüse und isolierten Pankreasinseln, die zum Zeit-

punkt der Transplantation avaskulär sind und vom Prozess der Angiogenese abhängig sind, damit das mikrovaskuläre Netzwerk für einen ausreichenden Blutzufluss wieder aufgebaut wird („primär avaskuläre Transplantation“) (Menger, Yamauchi, & Vollmar, 2001). Dieser Ablauf kann idealerweise im Rückenhautkammermodell analysiert werden. Entsprechend sind die Technik der Inseltransplantation (Menger et al., 1989; Menger, Jager, Walter, Hammersen, & Messmer, 1990) und die Methoden für heterotopische Nebenschilddrüsen Transplantation (Strieth et al., 2005) eingeführt worden.

Die Intravitalmikroskopie hat gezeigt, dass avaskuläre, frei transplantierte Inseln und sogar Pseudo-Inseln eine neue Mikrovaskulatur entwickeln, die der von Pankreasinseln *in situ* ähnelt (Menger, Vajkoczy, Beger, & Messmer, 1994; Beger, Cirulli, Vajkoczy, Halban, & Menger, 1998). Dieses ist von großem Interesse, da das Endothel von neu gebildeten Gefäßen aus den Gefäßen des Empfängergewebes entsteht (Vajkoczy et al., 1995). Die Reinheit der isolierten Inseln ist ausschlaggebend für die erfolgreiche Vaskularisation (Heuser, Wolf, Vollmar, & Menger, 2000). Weder Kryopräservierung der isolierten Inseln vor der Transplantation noch Hyperglykämie des Empfängers verstärken den angiogenetischen Prozess (Menger et al., 2001; Menger et al., 1992; Menger, Vajkoczy, Leiderer, Jager, & Messmer, 1992). Dagegen hemmen Immunsuppressiva wie Cyclosporine, Deoxyspergualin und RS-61443 eine adäquate Vaskularisation (Menger et al., 2001; Menger, Wolf, Hobel, Schorlemmer, & Messmer, 1991; Beger & Menger, 1997; Vajkoczy, Vollmar, Wolf, & Menger, 1999), während eine zusätzliche anti-oxydative Behandlung mit Vitamin E wirkungsvoll die Transplantatabstoßung reduziert, ohne dabei den Vorgang der Vaskularisation zu beeinflussen (Vajkoczy, Lehr, Hubner, Arfors, & Menger, 1997).

2.4.7 Perspektiven

Angiogenese ist ein komplexer Vorgang, der in die Pathogenese vieler Krankheitsbilder involviert ist. Die Mechanismen der Gefäßentstehung sind teilweise verstanden, dennoch erfordern sie weitere ausgeklügelte experimentelle Untersuchungen. Rückenhautkammermodelle liefern ideale Bedingungen um Angiogenese über bestimmte Zeit *in vivo* zu untersuchen. Der Vorteil an diesen Kammermodellen ist, dass sie detaillierte Informationen über funktionale Parameter, wie Gefäßwachstum, Durchblutung, Gewebeatmung, Gefäßpermeabilität und vasomotorische Reaktion liefern (Menger et al., 2006). Der Nachteil ist die anspruchsvolle chirurgische Präparation und die Zeitspanne von 48 Stunden, die erforderlich ist, um dem Gewebe Zeit zur Erholung zu geben. Außerdem erfordert die Auswertung der funktionalen Parameter mit dem Computer-assistierten, dynamischen Image-Analyse-System viel Zeit (Menger et al., 2006). Dadurch, dass der kombinierte Nutzen der Intravitalmikroskopie gleichzeitig die Stu-

dien von zellulären, molekularen, und funktionalen Parametern ermöglicht, haben wir einen Ansatz zur Verfügung, der unser Verständnis über die Verbindung von Angiogenese und Genexpression, Zell-Zell Interaktion, Zellmigration, Zellproliferation und Zelltod steigert. Demzufolge wird das Kammermodell in der biomedizinischen Forschung weiterhin für die Entwicklung von neuartigen therapeutischen Strategien und für das Gegenwirken von Tumorwachstum, Endometriose, chronisch ischämischen Krankheiten und von verminderter Knochenheilung genutzt. Von allergrößtem Interesse für die Zukunft ist die Frage, ob Forschung mit diesem Kammermodell auch zu einer Verbesserung der Vaskularisation von Fremdmaterial und dreidimensionalen Gerüsten (Scaffolds) in Gewebeherstellung und Organersatz dienen kann (Menger et al., 2006).

2.4.8 Welche Faktoren sind proangiogen, welche antiangiogen? Welche sind bei einem akuten Lungenschaden zu erwarten?

Angiogenese ist ein physiologischer Prozess, der die Entstehung von neuen Blutgefäßen durch das Wachstum aus bereits existierenden Kapillaren, hauptsächlich durch Sprossung aus dem Kapillarsystem, darstellt (Gilbert S.F., 2000) (siehe Kapitel 2.4.1). Dieser Prozess ist sehr komplex. Zur Bildung der Gefäßwände werden Endothelzellen, Perizyten und glatte Muskelzellen benötigt, die wiederum durch unterschiedliche angiogenetische Wachstumsfaktoren aktiviert werden (Rubanyi, 2000). Die Kapillare wird durch das umgebende Gewebe lysiert und Zellausläufer migrieren in das Gewebe. Die vorbestehenden Endothelzellen proliferieren und migrieren, wodurch neue Kapillaren entstehen. Schließlich werden die entstandenen Kapillaren in Arteriolen, Arterien, Venolen und Venen umgewandelt. Dieser Entwicklungsgang wird durch Wachstumsfaktoren getriggert und durch die Aktivierung bestimmter Gene geregelt (Rubanyi, 2000).

Angiogenese ist ein normaler und vitaler Prozess bei Phasen von Wachstum und Entwicklung sowie in der Wundheilung. Des Weiteren ist es ein fundamentaler Schritt bei der Umwandlung von Tumoren von einem untätigen zu einem malignen Stadium (Greenblatt & Shubi, 1968). Die heute übliche Terminologie der Angiogenese teilt in Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese (Formierung von mittelgroßen Blutgefäßen, die über eine Tunica media und eine Adventitia verfügen) ein. Meist wird der Begriff „Angiogenese“ jedoch als Überbegriff für alle Untertypen des Gefäßwachstums verwendet (Rubanyi, 2000).

Der Prozess der Angiogenese ist sowohl biologisch als auch medizinisch von wesentlicher Bedeutung. In der Medizin wird dieser Prozess einmal in der antiangiogenen als auch in der proangiogenen Therapie verwendet (Rubanyi, 2000). Angiogenese kann ein Ziel bei der Bekämpfung von Krankheiten sein, die durch entweder sehr arme Durchblutung oder durch abnorme Blutgefäße charakterisiert sind. Die Applikation von

spezifischen Faktoren, die die Gefäßneubildung inhibieren oder induzieren können, kann bei der Bekämpfung von solchen Krankheiten helfen (Rubanyi, 2000). Verschiedene Krankheitsbilder wie z.B. ischämische chronische Wunden sind das Resultat von einem Fehlen oder einer ungenügenden Blutgefäßbildung und können durch eine lokale Expansion der Blutgefäße behandelt werden, was dazu führt, dass neue Nährstoffe in das betroffene Gebiet gebracht werden, was wiederum die Reparatur erleichtert. Andere Krankheiten, wie zum Beispiel die altersabhängige Makuladegeneration, kann durch die lokale Expansion von Blutgefäßen erzeugt werden (Folkman et al., 1987).

Anti-angiogenetische Therapien werden zum Beispiel bei Tumoren verwendet, die von einem mitwachsenden Kapillarnetz abhängig sind. Durch diesen Ansatz kann die Durchblutung des Tumorgewebes reduziert werden (Benny et al., 2008).

Pro-angiogene Therapieformen werden wiederum zur Behandlung von kardiovaskulären Krankheiten - der Haupttodesursache in den westlichen Ländern - zum Beispiel Arteriosklerose, insbesondere der koronaren Herzkrankheit und der peripheren Verschlusskrankheit eingesetzt (Simons et al., 2000; Schumacher, Pecher, von Specht, & Stegmann, 1998; Folkman, 1998; Stegmann, 1998; Stegmann & Hoppert, 1999).

Bezüglich der pro-angiogenen Therapie kann in drei Hauptkategorien unterteilt werden: Die Gen-Therapie, die die Gene von Interesse verstärkt oder inhibiert, die Protein-Therapie, die in erster Linie angiogene Wachstumsfaktoren wie FGF-1 oder den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF manipuliert (Ornitz & Itoh, 2001; Blaber, DiSalvo, & Thomas, 1996; Khurana & Simons, 2003), und die Zell-basierte Therapie, die die Implantation von spezifischen Zelltypen beinhaltet.

Bis heute konnte eine Vielzahl an unterschiedlichsten angiogenen Faktoren festgestellt, ihre Aminosäuresequenzen ermittelt und ihre Gene geklont werden. Diese angiogenen Faktoren agieren entweder direkt an den Gefäßendothelzellen, um dort die Lokomotion oder Mitose zu stimulieren, oder aber agieren indirekt, indem sie Wirtzellen mobilisieren (Folkman et al., 1987).

Einige wichtige pro-angiogene Faktoren sollen im Folgenden erläutert werden:

- Fibroblast growth factor (FGF):

Die FGF-Familie mit ihren Prototyp-Mitgliedern FGF-1 (acidic FGF) und FGF-2 (basic FGF) besteht aus mindestens 22 bekannten Mitgliedern (Ornitz et al., 2001). Die meisten von ihnen sind Einzelketten-Peptide von 16-18kDa und haben eine hohe Affinität zu Heparin und Heparansulfat. Im Allgemeinen stimulieren FGF's eine Vielzahl an zellulären Funktionen, indem sie an FGF-Rezeptoren an der Zelloberfläche in der Gegenwart von Heparanproteoglykanen binden. Die Aktivierung am Rezeptor bewirkt eine Signaltransduktionskaskade, was zu einer Genaktivierung und diversen biologischen

Antworten führt. So kommt es zum Beispiel zur Zelldifferenzierung, Proliferation und Auflösung der Matrix, was eine mitogene Aktivität initiiert, die kritisch für das Wachstum von endothelialen Zellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen ist. FGF-1 - einzigartig unter den 22 Mitgliedern der FGF-Familie -, kann an alle sieben FGF-Rezeptor-Subtypen binden, was ihn zum wichtigsten Faktor dieser Gruppe macht und zu einem potenten mitogenen Faktor für diverse Zelltypen. Dies ist für eine angiogene Antwort in geschädigten hypoxischen Geweben nötig, wo es zu einer Hochregulation von FGF-Rezeptoren kommt (Blaber et al., 1996). FGF-1 stimuliert die Proliferation und Differenzierung von allen Zelltypen, die für den Aufbau eines arteriellen Gefäßes von Nöten sind, wie z.B. endotheliale Zellen und glatte Muskelzellen. Diese Tatsache unterscheidet FGF-1 von anderen pro-angiogenen Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF, was primär die Formation von neuen Kapillaren bewirkt (Khurana et al., 2003; Stegmann, 1998).

In mehreren Studien wurde bisher erfolgreich das angiogene Protein FGF-1 direkt in den geschädigten Herzmuskel injiziert (Stegmann et al., 2000). Eine andere Studie zeigt, wie wichtig die FGF's für die Entwicklung der embryonalen Lunge sind (Lin, Zhang, Bismarck, & Bishop, 2010). Li et al. zeigten 2009 die hohe Ausschüttung von FGF-2 beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) korrelierend mit der Anzahl an Metastasen und der Tumordinvasion (Li et al., 2009).

FGF-2 fördert die Angiogenese, indem es die Proliferation der endothelialen Zellen und die physikalische Anordnung von endothelialen Zellen in tubenähnliche Strukturen anregt. FGF-2 ist ein potenterer angiogener Faktor als VEGF oder PDGF (platelet derived growth factor), aber dennoch weniger potent als FGF-1. FGF-1 und FGF-2 stimulieren nicht nur das Blutgefäßwachstum, sondern spielen auch in der Wundheilung eine sehr wichtige Rolle. Sie stimulieren die Proliferation von Fibroblasten und endothelialen Zellen, die wiederum die Angiogenese und Entwicklung von Granulationsgewebe fördern. Beide Faktoren steigern die Blutversorgung und füllen eine Wundhöhle bereits sehr früh im Wundheilungsprozess auf (Stegmann, 1998).

- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF):

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist ein chemisches Signal, das von Zellen produziert wird, um das Wachstum von neuen Blutgefäßen zu stimulieren. Seine normale Funktion ist es, neue Blutgefäße während der Embryonalentwicklung, nach einer Verletzung, Muskeln nach Training und neue Blutgefäße (Kollateralzirkulation) zu generieren, um verstopfte Gefäße zu umgehen (Ding et al., 2004; Gavin et al., 2004; Kraus, Stallings, III, Yeager, & Gavin, 2004; Lloyd, Prior, Yang, & Terjung, 2003).

Wenn VEGF überexprimiert wird, kann dies zu Krankheiten führen. Solide Tumoren können ab einer bestimmten Größe nicht ohne eine adäquate Blutversorgung weiter

wachsen. Tumoren, die VEGF exprimieren können, sind in der Lage zu wachsen und zu metastasieren. Die Überexprimierung von VEGF kann zu Gefäßkrankheiten in der Retina oder in anderen Regionen des Körpers führen. Medikamente wie z.B. Bevacizumab können VEGF inhibieren und solche Krankheiten regulieren oder verlangsamen. VEGF sind Signalproteine, die in sowohl Vaskulogenese als auch Angiogenese involviert sind (Ding et al., 2004).

Das wichtigste Mitglied der VEGF-Subfamilie ist VEGF-A. Es stimuliert Endothelialzell-Mitogenese und Zellmigration. Außerdem ist es ein Vasodilatator, ist chemotaktisch für Makrophagen und Granulozyten und steigert die Mikrogefäßpermeabilität. Andere Mitglieder sind Placenta growth factor (PlGF), VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D. VEGF-B spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Angiogenese. VEGF-C wird für die Lymphangiogenese gebraucht und VEGF-D für die Entwicklung von Lymphgefäßen um die Bronchiolen herum. PlGF ist wichtig für Vaskulogenese und Angiogenese bei Ischämie, Entzündung, Wundheilung und Krebs (Kraus et al., 2004).

Zellen, die nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden, produzieren HIF, hypoxia inducible factor, einen Transkriptionsfaktor. HIF stimuliert neben anderen Funktionen die Freisetzung von VEGF. Die zirkulierenden VEGF binden an die VEGF-Rezeptoren der Endothelialzellen, was einen Tyrosinkinase-Signalweg triggert, der zur Angiogenese führt (Kraus et al., 2004).

Nun noch einige klinische Beispiele: VEGF wurde in den Zusammenhang mit schlechter Prognose bei Brustkrebs gebracht. Viele Studien zeigen ein erniedrigtes Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben bei Tumoren, die VEGF überexprimieren. VEGF wird ebenso bei rheumatoider Arthritis als Antwort auf TNF- α ausgeschüttet, was die endotheliale Permeabilität und die Schwellung vergrößert und die Angiogenese stimuliert. VEGF ist außerdem bei diabetischer Retinopathie bedeutsam. Die mikrozirkulatorischen Probleme in der Retina von Diabetikern können zu einer retinalen Ischämie führen, die zu einer Freisetzung von VEGF führt, was wiederum zu einer Bildung von neuen Blutgefäßen in der Retina und sonst im Auge führen kann (Praidou et al., 2010).

VEGF spielt weiterhin eine Rolle in der Krankheitspathologie der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD), die die Hauptursache für Blindheit des älteren Menschen in der industrialisierten Welt ist (Praidou et al., 2010).

VEGF-D Serumspiegel sind signifikant erhöht bei Patienten mit Angiosarkom (Amo, Masuzawa, Hamada, & Katsuoka, 2004).

Sobald VEGF freigesetzt worden ist, kann es verschiedene Antworten auslösen. Es kann eine Zelle dazu bringen, zu überleben, sich zu bewegen oder sich weiter zu differenzieren. Infolgedessen ist VEGF ein mögliches Ziel für die Behandlung von Krebs.

Das erste anti-VEGF-Medikament, der monoklonale Antikörper Bevacizumab, wurde 2004 entwickelt. Dementsprechend gibt es auch andere Anti-VEGF-Therapien für die Behandlung von bestimmten Krebserkrankungen.

Patienten mit Lungenemphysem haben bewiesenermaßen reduzierte Spiegel an VEGF in den Pulmonalarterien.

In der Niere führt eine vermehrte Freisetzung von VEGF in den Glomeruli direkt zu einer glomerulären Hypertrophie, die mit Proteinurie assoziiert ist (Liu et al., 2007).

- Angiopoietine:

Die Angiopoietine Ang 1 und Ang 2 sind für die Bildung von voll entwickelten Blutgefäßen notwendig, wie Studien an Knockout-Mäusen zeigen konnten (Haas et al., 2000). Ang 1 und Ang 2 sind Proteinwachstumsfaktoren, die durch die Bindung an ihre Rezeptoren wirken (Haas et al., 2000).

- Matrix Metalloproteinases (MMP's):

Ein weiterer wichtiger mitwirkender Faktor bei der Angiogenese sind MMP's. Sie helfen, die Proteine abzubauen, die die Gefäßwand fest machen. Diese Proteolyse erlaubt es den endothelialen Zellen, in den Interstitialraum zu entweichen, wie das bei der sprießenden Angiogenese der Fall ist. Die Inhibition der MMP's verhindert die Bildung von neuen Kapillaren (Lobov et al., 2007). Diese Enzyme sind während der Gefäßbildung hochreguliert, da eine Zerstörung der extrazellulären Matrix die Integrität der Mikrogefäße herabsetzen würde.

- Platelet derived growth factor (PDGF und PDGFR):

PDGF ist ebenfalls einer der vielen Wachstumsfaktoren oder Proteine, die das Zellwachstum und die Zellteilung regulieren, es spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese. Es existieren fünf verschiedene Isoformen von PDGF, die eine Zellantwort durch zwei verschiedene Rezeptoren aktivieren. Der Rezeptor für PDGF, PDGFR ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), eine Sorte von Zelloberflächenrezeptoren. Zwei Arten von PDGFRs wurden bisher identifiziert: Alpha-Typ und beta-Typ PDGFRs (Matsui et al., 1989). Der Alphotyp bindet an PDGF-AA, PDGF-BB und PDGF-AB, während der Betatyp PDGFR mit hoher Affinität an PDGF-BB und PDGF-AB bindet (Heidaran et al., 1991). PDGF bindet an die PDGFR-Ligandenbindungstasche, die innerhalb der zweiten und dritten Immunglobulindomäne lokalisiert ist (Heidaran, Pierce, Jensen, Matsui, & Aaronson, 1990). Nach Aktivierung durch PDGF, dimerisieren diese Rezeptoren und werden durch verschiedene Signalwege wie z.B. den PI3K-Signalweg aktiviert. Nachgeordnete Effekte hiervon beinhalten die Regulation von Genexpression und den Zellzyklus. Mehrere Studienergebnisse weisen darauf hin, dass PI3K als Teil des Wachstumssignalkomplexes eine wichtige Rolle beim Kontrollieren der Zellmigration spielt (Yu et al., 1995).

PDGF ist bedeutend in der embryonalen Entwicklung, in der Zellproliferation, Zellmigration und der Angiogenese (Barres et al., 1992).

- **CXC-Chemokine:** Chemokine sind eine Superfamilie aus strukturhomologen Heparinbindungsproteinen, die Tumorstadium und Metastasierungen beeinflussen. Viele Mitglieder der CXC- und CC-Chemokinfamilien sind potente Induktoren von Neovaskularisation, wobei eine Teilmenge der CXC-Chemokine potente Inhibitoren sind (Keeley, Mehrad, & Strieter, 2010).

- **CXCL1 (früher GRO-alpha):** Wichtig für die Wundheilung und die Angiogenese (Yew et al., 2010).

- **CXCL 5 (endothelial neutrophil activating peptide-78 (ENA 78)):** Ebenfalls wichtig für die Angiogenese (Jafri et al., 2010; Bersinger, Gunthert, McKinnon, Johann, & Mueller, 2010), und genauso wie Interleukin-8 und CXCL 1 mit dem Aminosäuremotiv ELR an der aktiven Stelle.

- **Interleukin-8:** Ebenfalls ein bekannter angiogener Faktor, der für Wundheilung und Angiogenese wichtig ist (Lee et al., 2011; Yew et al., 2010).

- **Integrine $\alpha\beta_3$, $\alpha\beta_5$ und $\alpha_5\beta_1$:** Diese Integrine binden Matrixmakromoleküle und Proteinasen (Santulli et al., 2011).

- **Vascular endothelin (VE)-Cadherin und CD 31:** Dies sind endotheliale Verbindungsmoleküle (Ahrens & Peter, 2009; Bazzoni & Dejana, 2001).

- **Ephrin:** Es veranlasst die Bildung von Arterien und Venen (Stein, Schoecklmann, & Daniel, 1997).

- **Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1:** Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI) regeln Plasminogenaktivierung in normalen und pathologischen Prozessen (Schneiderman & Loskutoff, 1991). Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) ist der wichtigste physiologische Inhibitor von Gewebe- und Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivatoren (Schneiderman et al., 1991). Es ist ein stark reguliertes single-chain-Glykoprotein, dessen Überexpression *in vivo* das fibrinolytische Gleichgewicht beeinträchtigt und mit thrombotischen Erkrankungen korreliert. Neuere klinische Beobachtungen zeigen einen Zusammenhang zwischen erhöhten Plasma-PAI-1 und symptomatischer koronarer arterieller Verschlusskrankheit oder tiefer Venenthrombose (Schneiderman et al., 1991).

- **CD 133 (AC-133+):** Wird manchmal als angiogener Faktor genannt, dürfte aber primär ein Molekül der Oberfläche von hämatogenen Stamm- und Progenitorzellen insbesondere von EPC sein (Bonaros et al., 2008).

- **DNA-binding protein inhibitor Id1 / Id3:** Diese Faktoren regulieren die endotheliale Transdifferenzierung. Die Überexpression von Id-Proteinen fördert die Krebszellproliferation und den Widerstand gegen Apoptose. (Mern, Hasskarl, & Burwinkel, 2010).

Zur Erklärung der wichtigsten anti-angiogenen Faktoren:

Angiogeneseinhibitoren sind sehr heterogen in ihrer Herkunft und ihrem Potenzial, und ihre wachsende Liste beinhaltet Proteolyseprodukte von größeren Molekülen mit einer anderen Funktion, wie z.B. Angiostatin, Endostatin und Vasostatin, Modulatoren der Aktivität von vaskulären endothelialen Wachstumshormonen, wie z.B. FLT-1 und manche Zytokin / Chemokine mit charakteristischer anti-endothelialer Aktivität, wie z.B. IL-12, IFN-alpha und CXCL10 (Persano, Crescenzi, & Indraco, 2007).

- löslicher Vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR-1) und Neuropilin-1 (NRP-1): Lockt Rezeptoren für VEGF-B und PlGF (Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein) (Marti H., 2000).

- Angiopoietin-2: Angiopoietine sind Proteinwachstumsfaktoren, die Angiogenese fördern. Bisher wurden vier Angiopoietine identifiziert, Ang1-4. Ang 1 und Ang 2 sind nötig für die Formierung von reifen Blutgefäßen, wie bei Studien an Knockoutmäusen gezeigt werden konnte (Thurston, 2003). Angiopoietin 2 (Ang 2) ist einer von 4 Liganden für Rezeptor Tie2 und kommt natürlicherweise als Antagonist für Tie2 vor, indem er die Aktion von Angiopoietin-1 (Ang1) inhibiert (Zadeh, Koushan, Baoping, Shannon, & Guha, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Ang 2 signifikant das Gefäßwachstum von malignen Astrozytomen verstärkt und dass eine konstante Hochregulation von Ang 2 während aller Phasen des Tumorwachstums abnormale Gefäßstrukturen generiert, die typischerweise nicht in menschlichen Astrozytomen gesehen werden. Daraus lässt sich schließen, dass Ang 2 eine tumorstadienabhängige Rolle spielt und nicht einheitlich während aller Tumorstadien des malignen Astrozytoms ausgeschüttet wird (Zadeh et al., 2010).

- Thrombospondin-1 und -2 (TSP-1 und TSP-2): Diese Faktoren inhibieren die Zellmigration, die Zellproliferation, die Zelladhäsion und das Überleben von endothelialen Zellen. Die Thrombospondine (TSP) sind eine Familie an multifunktionalen Proteinen, unterteilt in Subtyp A, der TSP-1 und -2 enthält und Typ B, der TSP-3, -4 und -5 enthält. TSP-1 und -2 werden durch unreife Astrozyten während der Gehirnentwicklung produziert, was die Entwicklung von neuen Synapsen fördert (Christopherson et al., 2005). TSP-1 wurde in biologischen Prozessen einschließlich der Angiogenese, Apoptose, Aktivierung von TGF-beta und der Immunregulation gefunden. TSP-1 ist als solches ein multifunktionales Protein. TSP-1 ist antiangiogen, es hemmt die Proliferation und Migration von Endothelialzellen durch Interaktion mit CD36, das auf der Oberfläche dieser Zellen exprimiert wird. Inhibitorische Peptide und Fragmente von TSP-1 binden an CD36, was zu einer Freisetzung von FAS Liganden (FasL) führt, der die Freisetzung von Fas aktiviert. Dieses wiederum führt zu einer Aktivierung von Caspa-

sen und zur Zellapoptose. Dadurch, dass Tumore mit einer Überexpression an TSP-1 typischerweise langsamer wachsen, weniger Angiogenese zeigen und weniger Metastasen haben, ist TSP 1 eventuell ein attraktives Ziel der Krebstherapie (Haviv et al., 2005).

- **Angiostatin und verwandte Moleküle:** Diese Faktoren inhibieren die Zellproliferation und induzieren die Apoptose von endothelialen Zellen.

Angiostatin ist ein 38kDa Fragment eines größeren Proteins, Plasmin (das wiederum ein Fragment von Plasminogen ist). Es beinhaltet drei bis fünf Kringle Module. Jedes Modul enthält zwei kleine beta-Bögen und drei Disulfidbrücken (Cao et al., 1996; O'Reilly et al., 1994). Angiostatin wird durch autoproteolytische Spaltung von Plasminogen produziert, was eine extrazelluläre Disulfidbrückenreduktion durch eine Phosphoglycerat-Kinase beinhaltet. Des Weiteren kann Angiostatin aus Plasminogen durch verschiedene Metalloproteinasen (MMPs), Elastase, Prostata-spezifisches Antigen (PSA), 13 KD-Serinprotease oder 24KD-Endopeptidase gespalten werden.

Angiostatin bindet mehrere Proteine, insbesondere an Angiomotin und endotheliale Zelloberflächen-ATP-Synthase, aber auch an Integrine, Annexin II, C-met Rezeptor, NG2-Proteoglykane, Gewebe-Plasminogen-Aktivator, Chondroitinsulfat-Proteoglykane und CD26. Zusätzlich können kleinere Fragmente von Angiostatin an diverse andere Proteine binden. Es scheint so zu sein, dass Angiostatin die endotheliale Zellmigration (Redlitz, Daum, & Sage, 1999) und Proliferation bremst und die Apoptose induziert. Man geht davon aus, dass die Aktivität von Angiostatin unter anderem mit der Zusammenstellung seiner mechanischen- und Redoxeigenschaften im Zusammenhang steht (Grandi et al., 2006).

- **Endostatin:** Endostatin ist ein natürlich vorkommendes 20kDa C-terminales Fragment, das vom Typ XVIII Kollagen abstammt. Endostatin ist ein Breitspektrum Angiogeneseinhibitor und kann mit den pro-angiogenen Aktionen der Wachstumsfaktoren wie basic Fibroblast Growth factor (bFGF / FGF-2) und VEGF interferieren (Folkman, 2006). Endostatin inhibiert die Zellmigration, die Zellproliferation und das Überleben von endothelialen Zellen (Folkman, 2006).

Downsyndrompatienten scheinen aufgrund ihrer erhöhten Spiegel an Endostatin vor diabetischer Retinopathie geschützt zu sein (Ryeom & Folkman, 2009).

- **Vasostatin, Calreticulin:** Diese Faktoren inhibieren die Zellproliferation von Endothelialzellen.

Vasostatin, die N-terminale Domäne von Calreticulin, ist ein potenter Angiogeneseinhibitor (Cai et al., 2008). Es ist in der Lage, Tumorstadium während verschiedener Stadien der Tumorstadium zu unterdrücken, was z.B. als Gentherapie in der Behandlung von Lungentumor benutzt werden kann (Cai et al., 2008)

Eine andere Studie konnte den inhibitorischen Effekt von Vasostatin auf die choroidale Neovaskularisation (CNV) bei der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) zeigen (Sheu et al., 2009).

Calreticulin (CRT) beaufsichtigt das endoplasmatische Retikulum (ER) und ist verantwortlich für Glykoproteinfaltung und Ca (2+)-Homöostase. Des Weiteren hat CRT extrazelluläre Funktionen, z.B. Tumor- und apoptotische Zellerkennung und Wundheilung; aber der Mechanismus der extrazellulären Freisetzung von CRT ist noch unbekannt. Es konnte gezeigt werden, dass unter apoptotischen Stressbedingungen die zytosolische Konzentration von CRT ansteigt (Tarr et al., 2010).

- Platelet Factor-4: Dieser Faktor ist genau wie Angiostatin ein antiangiogener Faktor (Bikfalvi, 2007) und inhibiert die Bindung von bFGF und VEGF.

Platelet factor-4 (PF4) ist ein kleines Zytokin, was zu der CXC-Chemokinfamilie gehört und außerdem bekannt ist unter den Namen Chemokine (C-X-C motif) ligand 4 (CXCL4). PF4 ist ein 70-Aminosäurenprotein, das von den Alpha-Granula von aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird und mit hoher Affinität an Heparin bindet. Seine Hauptrolle besteht in der Neutralisation von heparinähnlichen Molekülen auf der endothelialen Oberfläche von Blutgefäßen, wobei die lokale Antithrombin III-Aktivität inhibiert und die Koagulation gefördert wird. Als ein stark chemotaktischer Faktor für Neutrophile und Fibroblasten hat PF4 eine wichtige Rolle bei Entzündung und Wundheilung (2010; Eisman, Surrey, Ramachandran, Schwartz, & Poncz, 1990). Der Heparin-PF4-Komplex ist das Antigen in Heparin induzierter Thrombozytopenie, eine eigenwillige Autoimmunreaktion auf die Gabe von Antikoagulans Heparin (Warkentin, 2007). PF4 spielt eine wichtige Rolle bei der Hämostase und der Thrombose (Kowalska, Rauova, & Poncz, 2010).

- tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) und cartilage-derived angiogenesis inhibitor (CDAI): Beide inhibieren die Zellmigration von Endothelialzellen. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) sind spezifische endogene Proteinase, die die Matrix Metalloproteinasen inhibieren. Die Proteinasefamilie besteht aus 4 Proteaseinhibitoren: TMP 1-4 (Brew, Dinakarpandian, & Nagase, 2000). CDAI steht für cartilage-derived angiogenesis inhibitor und ist ein Angiogenese Inhibitor, der aus Knorpel produziert wird. Dazu gehören z.B. das Peptid Troponin I (Kern, Balcom, Antoniu, Warshaw, & Fernandez-del Castillo, 2003) und Chondromodulin I (Setoguchi et al., 2004).

- IFN- α , - β und - γ , CXCL 10, IL-4, -12 und -18: Diese Faktoren inhibieren die Zellmigration von endothelialen Zellen und regulieren bFGF herunter.

- Prothrombin und Antithrombin III: Sie inhibieren die Zellproliferation von endothelialen Zellen. Antithrombin (AT) ist ein kleines Proteinmolekül, das verschiedene Enzyme des Koagulationssystems inaktiviert. Es ist ein Glykoprotein, das durch die Leber

produziert wird, aus 432 Aminosäuren besteht und drei Disulfidbrücken enthält. Die physiologischen Zielproteasen von Antithrombin III sind die aktivierten Formen des intrinsischen und extrinsischen Weges der Gerinnungskaskade (Persson, Bak, & Olsen, 2001). Die gespaltene und latente Form von Antithrombin hemmt sehr potent die Angiogenese und das Tumorwachstum in Tiermodellen (O'Reilly, Pirie-Shepherd, Lane, & Folkman, 1999).

- **Prolactin:** Prolactin ist ein antiangiogener Faktor, da es bFGF und VEGF inhibiert. Sämtliche Mitglieder des Wachstumshormon-/Prolactin-Plazenta-Laktogen-, des Renin-Angiotensin- und des Kallikrein-Kinin-Systems, die stimulierende Effekte auf die Angiogenese ausüben, können antiangiogene Eigenschaften annehmen, nachdem sie sich proteolytisch gespalten haben (Clapp, Thebault, Jeziorski, & Martinez, 2009).

- **Vascular endothelial growth inhibitor (VEGI)**, auch bekannt als tumor necrosis factor superfamily member 15 (TNFSF15) und TNF ligand related molecule (TL1), ist ein kürzlich identifiziertes anti-angiogenes Zytokin, das zur TNF-Superfamilie gehört. Es sind bisher drei Isoformen dokumentiert worden (Zhang, Sanders, Ye, & Jiang, 2009).

Das Protein wird überreichlich von endothelialen Zellen freigesetzt, aber es wird weder in B- noch T-Zellen freigesetzt. Die Freisetzung von VEGI kann durch TNF und IL-alpha ausgelöst werden. VEGI kann NF-kappa B und MAP-Kinasen aktivieren und agiert als ein autokriner Faktor, um die Apoptose in endothelialen Zellen zu induzieren. Des Weiteren vermag dieses Protein, die Endothelialzellproliferation zu hemmen und hat so eine Funktion als Angiogenesehemmer (Holmes, Roberts, Thomas, & Cross, 2007). Erste Studienergebnisse weisen darauf hin, dass VEGI ein möglicher Tumorstromungshemmer sein könnte (Zhang et al., 2009). Die hemmenden Effekte von VEGI im Tumorgewebe sind in drei Gebieten manifest, der direkte Effekt auf die Krebszellen, der antiangiogene Effekt auf die Endothelialzellen und die Stimulation der Reifung von dendritischen Zellen (Zhang et al., 2009).

- **Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine (SPARC):** Dieser Faktor inhibiert die Bindung und Aktivität von VEGF.

- **Osteopontin:** Osteopontin (OPN), auch bekannt als Bone Sialoprotein I (BSP-I), early T-lymphocyte activation (ETA-1), und secreted phosphoprotein 1 (SPP1), ist ein extrazelluläres Glykoprotein, das 1986 in Osteoblasten erstmalig isoliert wurde. Es wird biosynthetisiert durch eine ganze Reihe von verschiedenen Gewebetypen wie Fibroblasten (Ashizawa et al., 1996), Preosteoblasten, Osteoblasten, Osteozyten, Odontoblasten, manche Knochenmarkzellen, dendritische Zellen, Makrophagen (Murry, Giachelli, Schwartz, & Vracko, 1994), glatte Muskelzellen (Ikeda, Shirasawa, Esaki, Yoshiki, & Hirokawa, 1993), Skelettmuskelmeyoblasten (Uaesoontrachoon et al., 2008),

Endothelialzellen und anderen. Es spielt eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel (Choi et al., 2008). Es besitzt chemotaktische Eigenschaften, die die Zellen zu den Entzündungsherden bringen. Außerdem fungiert es als ein adhäsives Protein, das in der Zellbefestigung und Wundheilung involviert ist. Des Weiteren vermittelt OPN die Zellaktivierung und Zytokinproduktion und fördert das Zellüberleben durch Regulieren der Apoptose (Wang & Denhardt, 2008). OPN blockiert zum einen den aktivierten Zelltod von Makrophagen und T-Zellen, wie auch den von Fibroblasten und Endothelialzellen, die schädlichen Stimuli ausgesetzt sind (Denhardt, Noda, O'Regan, Pavlin, & Ber- man, 2001; Standal, Borset, & Sundan, 2004). Zum Anderen verhindert Osteopontin den nicht programmierten Zelltod bei der entzündlichen Kolitis (Da Silva et al., 2006). OPN wird bei einer Vielzahl von Tumoren übermäßig freigesetzt, wie z.B. Lungentumor (Cui et al., 2007), Brustkrebs, Endometriumcarcinom (Du, Jiang, Sheng, Gao, & Li, 2009), Kolorektaltumor, Magentumor, Ovarialcarcinom, Melanom und Mesotheliom. OPN trägt zu sowohl Glomerulonephritis als auch zur tubulointerstitialen Nephritis bei, und OPN findet man in artheromatösen Plaque in Arterien. Die Manipulation der Spiegel von Osteopontin ist also möglicherweise bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten, Karzinommetastasen, Osteoporose und bei manchen Formen des Stressses nützlich (Wang et al., 2008). Studien haben außerdem gezeigt, dass Osteopontin bei der Bildung von übermäßigen Narben beteiligt ist, und ein Gel konnte entwickelt werden, um diesen Effekt zu blockieren (BBC, 2008).

- **Maspin:** Maspin (mammary serine protease inhibitor), ein Mitglied der Serpin-Familie, hemmt Angiogenese, Tumorinvasion und Metastasen (Webber, Lawson, & Cohen, 2008). Studien lassen einen p53-abhängigen Regulationsweg der Maspin-Freisetzung vermuten (Webber et al., 2008). Sein Fehlen korreliert mit der Krankheitsprogression sowohl bei Brustkrebs als auch Prostatakrebs (Webber et al., 2008; Shao, Shi, Ayala, Rowley, & Zhang, 2008). Es wurde 1994 identifiziert (Khalkhali-Ellis, 2006).

- **Transforming growth factor (TGF- β):**

Transforming growth factor beta 1 oder TGF- β 1 ist ein Polypeptid, das verschiedene Zellfunktionen wie die Kontrolle des Zellwachstums, der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und der Apoptose innehat. Beim Menschen ist TGF- β 1 kodiert durch das TGFB1-Gen (Ghadami et al., 2000; Vaughn et al., 2000). Viele Zellen synthetisieren TGFB, und fast alle dieser Zellen haben spezifische Rezeptoren für dieses Peptid. TGFB1, TGFB2 und TGFB3 funktionieren alle durch das gleiche Rezeptorsignalsystem (Maglott, Ostell, Pruitt, & Tatusova, 2007).

TGF- β 1 wurde erstmalig in menschlichen Thrombozyten als ein Protein mit einer Molekularmasse von 25kD und einer potentialen Rolle in der Wundheilung identifiziert (Assoian, Komoriya, Meyers, Miller, & Sporn, 1983). Später wurde es als ein großer

Proteinvorläufer charakterisiert, der proteolytisch verarbeitet wurde, so dass ein ausge-reiftes Peptid mit 112 Aminosäuren entstehen kann (Derynck et al., 1985).

TGF-beta1 und VEGF sind potente Angiogenese-Induktoren mit gegenläufigen Effek-ten auf Endothelzellen. TGF-beta1 induziert Apoptose, VEGF schützt Endothelzellen vor Apoptose. Es konnte gezeigt werden, dass TGF-beta1 die Endothelzellen Expres-sion von FGF-2 fördert, die wiederum die VEGF-Synthese hochreguliert (Ferrari et al., 2006).

TGF- β 1 spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Immunsystems und zeigt unter-schiedliche Aktivitäten bei verschiedenen Zelltypen oder Zellen in verschiedenen Ent-wicklungsstadien. Die meisten Immunzellen (oder Leukozyten) sezernieren TGF- β 1 (Letterio & Roberts, 1998b).

Manche T-Zellen (z.B. regulatorische T-Zellen) setzen TGF- β 1 frei, um die Aktionen der anderen T-Zellen zu inhibieren. Die Interleukin 1 und Interleukin 2-abhängige Proli-feration von aktivierten T-Zellen (Wahl et al., 1988; Tiemessen et al., 2003) und die Aktivierung von untätigen T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen werden durch die Aktivierung von TGF- β 1 verhindert (Gilbert, Thoman, Bauche, Pham, & Weigle, 1997; Wahl, Wen, & Moutsopoulos, 2006). Ähnlich kann TGF- β 1 die Sekretion und die Akti-vierung von vielen anderen Zytokinen wie z.B. Interferon- γ , TNF- α und verschiedene Interleukine inhibieren. Es kann außerdem die Freisetzungsrates von Zytokinrezeptoren wie z.B. IL-2 Rezeptoren reduzieren, um die Aktivität von Immunzellen herunterzuregu-lieren. TGF- β 1 kann jedoch auch die Freisetzung von bestimmten Zytokinen in T-Zellen erhöhen und ihre Proliferation fördern, insbesondere wenn die Zellen noch unreif sind (Letterio & Roberts, 1998a).

TGF- β 1 hat auf B-Zellen ähnliche Effekte, die sich bezüglich des Differenzierungssta-diums der Zelle verändern. Es bremst die Proliferation und die Apoptose der B-Zellen (Lebman & Edmiston, 1999) und spielt eine Rolle bei der Kontrolle der Freisetzung von Antikörpern, Transferrin und MHC Klasse II-Proteinen auf unreifen und reifen B-Zellen (Letterio et al., 1998a; Lebman et al., 1999).

Der Effekt von TGF- β 1 auf Makrophagen und Monozyten ist überwiegend hemmend; das Zytokin kann die Proliferation von diesen Zellen inhibieren und deren Produktion von reaktivem Sauerstoff und Stickstoffzwischenprodukten verhindern. Bei anderen Zelltypen kann TGF- β 1 jedoch den gegenteiligen Effekt auf die Myeloidzellen haben. Z.B. agiert TGF- β 1 als ein chemischer Lockstoff, indem es eine Immunantwort auf manche Pathogene richtet. Überdies kann die Freisetzung von monozytischen Zytoki-nen (einschließlich IL-1-alpha, IL-1-beta und TNF- α) (Wahl et al., 2006) und die Phago-zytose der Makrophagen durch TGF- β 1 aktiviert werden (Letterio et al., 1998a).

Neben diesen Faktoren gibt es viele exogene Angiogeneseinhibitoren, die als Medikamente gegeben werden können oder als leichte Form in der Ernährung vorkommen. Auf diesem Gebiet wird aufgrund des Strebens nach besserer Krebstherapie intensiv geforscht (Farina, Pomies, Alonso, & Gomez, 2006; Liu et al., 2005; Stanley, Harvey, Slivova, Jiang, & Sliva, 2005).

Das Gewebeüberleben nach akutem Lungenschaden (ALI) hängt von der sofortigen Alveolarreparatur ab, ein Prozess, der häufig durch die Bildung von Granulationsgewebe innerhalb der Alveolen gestört wird (Henke et al., 1991). Eine immunhistochemische Untersuchung des intraalveolären Granulationsgewebes zeigt, dass sowohl Kapillaren als auch Myofibroblasten die wichtigsten Zellbestandteile darstellen (Henke et al., 1991). Es konnten nach einem ALI angiogene Faktoren auf der Luft-Lungen-Grenzfläche ausgemacht werden (Henke et al., 1991).

Ältere Studien zeigten bei Lungenkrankheiten lediglich auftretende Zytokine, die durch die Alveolarmakrophagen freigesetzt wurden (Lindsay, 2010). Es sind jedoch sowohl strukturelle Zellen wie auch Immuneffektorzellen der Lunge in der Lage, Zytokine zu produzieren und freizusetzen (Kelley, 1990). Die Zytokine, die in den Studien identifiziert werden konnten, waren platelet derived growth factor (PDGF), Interleukin-1 (IL-1), transforming growth factor-beta (TGF-beta), tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), insulinlike growth factor I (IGF-I) und Interleukin-6 (IL-6) (Kelley, 1990).

Eine andere Studiengruppe nutzte 2010 die Tatsache, dass das Kontaktherbizid Paraquat in Menschen und Versuchstieren einen akuten Lungenschaden hervorrufen kann (Jian et al., 2010). Die mit Paraquat behandelten Ratten zeigten eine gesteigerte Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie platelet-derived growth factor-A, insulinlike growth factor-1 und transforming growth factor-beta 1 (Jian et al., 2010).

Wieder andere Studiengruppen erhoffen sich von einigen Wachstumshormonen wie keratinocyte growth factor (KGF), epithelial growth factor (EGF) und basic fibroblast growth factor (bFGF) die Möglichkeit, bei akuten Lungenschäden die geschädigten Alveolarwände zu reparieren (Lindsay, 2010).

2.5 Acute Lung Injury (ALI) und Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)

Die Lunge ist sehr stark durchblutet, da sie seriell in den Körperblutkreislauf zwischengeschaltet ist und außerdem eine hohe Minutenventilation hat. Diese beiden Gegebenheiten bedingen die große endotheliale Oberfläche, die flächenmäßig fast an die Alveolaroberfläche herankommt (Weibel & Taylor, 1988). Endothelzellen haben vielfältige Aufgaben: Sie regulieren den Transport von Nutrienten und Mediatoren, die Adhäsion

und Migration von Immunzellen, inflammatorischen und weiteren Zellen (eventuell auch von zirkulierenden Tumorzellen), den vaskulären Tonus, die Dichte und die Selektivität der Barriere zwischen Blut und Interstitium (Lin, Weisdorf, Solovey, & Hebbel, 2000). Endothelzellen sind in den unterschiedlichsten pathophysiologischen Zuständen wie z.B. Entzündung, Angiogenese oder Hämostase von großer Wichtigkeit (Rafii, 2000).

2.5.1 Definitionen

Das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) ist eine schwere Form von akutem Lungenversagen. Durch diffuse Schädigung der alveolarkapillären Membran v.a. in den abhängigen Lungenarealen kommt es zu einer akuten respiratorischen Insuffizienz (Sagara, Horie, Anezaki, Miyazawa, & Iizuka, 2010; Greer, 2010b). Das Krankheitsbild ist definiert durch einen akuten Beginn mit meist intubationspflichtigen arteriellen Hypoxien, durch eine $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ von weniger als 200mmHg, und bilaterale diffuse Infiltrate in Form eines Schmetterlings im Röntgenbild. Für die Diagnosestellung eines ARDS sollte immer eine Linksherzinsuffizienz und eine linksatriale Hypertonie ausgeschlossen werden. 1994 definierte die American-European Consensus Conference das ARDS als schwerwiegendste Verlaufsform der „Acute Lung Injury“ (ALI) und erstellte einen Behandlungskatalog. Die ALI beschreibt die American-European Consensus Conference als ein Syndrom mit Entzündungsreaktion und erhöhter Permeabilität. Sie weist ein typisches Muster an klinischen, radiologischen und physiologischen Abnormalitäten auf und sei nicht durch die linksatriale oder pulmonale Hypertonie zu erklären, die mit der ALI häufig auftrete.

Oft ist die Acute Lung Injury assoziiert mit Sepsis, Aspiration, Pneumonie, Polytrauma, seltener mit kardiopulmonalem Bypass, Massentransfusion, Fettembolien, Pankreatitis u.a. (Bernard et al., 1994).

2.5.2 ARDS - eine Krankheit mit hoher Mortalität: Epidemiologie und Geschichte

Aufgrund einer kaum verbesserten Mortalität von 30-50% und einer Inzidenz von einer Person auf 1500 jährlich ist das Acute Respiratory Distress Syndrome weiterhin eine Herausforderung für Wissenschaftler und Kliniker (Bernard et al., 1994; Petty, 2003a; Ware & Matthay, 2000). Auch eine neuere Studie gibt eine ähnliche Inzidenz mit circa 80 Fällen pro 100000 Personenjahre an (Rubenfeld et al., 2005). Auf Intensivstationen ist das ARDS nur in ca. 7% für ein akutes respiratorisches Versagen verantwortlich (Roupie, 2000). Man geht jedoch davon aus, dass es bei ca. 15-20% der Patienten, die intubiert und länger als 24 Stunden auf einer Intensivstation sind, die Ursache für ein akutes Atemversagen ist (Luhr et al., 1999).

Geschichtlich muss man bis zum Ersten Weltkrieg zurückgehen, da bereits damals bei Kriegsverletzten vielfach progressive Lungenversagen beobachtet werden konnten. 1967 beschrieben Ashbaugh et al. dieses Syndrom bei 12 Patienten. Ihnen allen war ein akut auftretendes, rasch progredientes Atemversagen, tachypnoeische Atmung, eine refraktäre Hypoxämie, diffuse bilaterale Lungeninfiltrate und eine verminderte respiratorische Compliance gemeinsam. Fünf dieser Erkrankten konnten mithilfe von mechanischer Beatmung mit positivem end-expiratorischem Druck am Leben erhalten werden. 1971 publizierten Ashbaugh und Petty den Kriterienkatalog zur Diagnosestellung des ARDS. Bis 1988 blieb dieser weitgehend unverändert und wurde erst 1994 durch den Katalog der American-European Consensus Conference ersetzt (Bernard et al., 1994).

2.5.3 ARDS: Klinik, Auslöser

Das ARDS ist charakterisiert durch Dyspnoe, schwere Hypoxämie mit respiratorischer Alkalose und im Verlauf durch eine Hyperkapnie. Dieser klinisch schwere Zustand kann innerhalb von einigen Stunden eine mechanische Beatmung notwendig machen. Die Ursache dieses Krankheitsbildes ist eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, die direkte oder indirekte Auslöser haben kann (Steinberg et al., 1994). Man unterscheidet das ARDS of pulmonary origin (Pneumonie, Aspiration) und extrapulmonalen Ursprungs (Sepsis, schweres Trauma, Massentransfusion). Es scheint biologische Unterschiede zu geben, z. B. dass bei indirektem Trauma der Endothelzelle eine ganz entscheidende Rolle in der Pathogenese zukommen dürfte. Direkte pulmonale Auslöser sind Pneumonie, Aspiration, Lungenkontusion, Inhalations- und Barotrauma, extrapulmonale Auslöser können Sepsis, Schock, Polytrauma, Verbrennung, Verbrauchskoagulopathie und eine Massentransfusion sein (Leutz & Sybrecht, 1999).

2.5.4 Pathogenese des ARDS

Das Krankheitsbild des ARDS wird pathophysiologisch in ein akutes exsudatives Stadium und ein darauf folgendes chronisches proliferatives Stadium unterteilt. Die Phasen können dabei fließend ineinander übergehen (Leutz et al., 1999).

Im akuten Stadium kommt es zu einem Untergang der Pneumozyten Typ I und zu einer erhöhten Permeabilität der alveolarkapillären Membran. Diese kommt durch einen diffusen transmuralen alveolären Zellschaden zustande, wobei die endothelial-interstitielle (d.h. endotheliale) und die interstitiell-alveoläre (d.h. epitheliale) Barriere zerstört werden (Steinberg et al., 1994). Folglich werden die Alveolarräume mit einem inflammatorischen Exsudat gefüllt, das ebenso viele Proteine wie Blutplasma enthalten kann. Es kommt zu einem Übertritt von Proteinen über 60 kDa Molekulargewicht im

Rahmen einer nicht-selektiven Schrankenstörung, wodurch konsekutiv der Surfactant inaktiviert wird (Petty, 2003b). Nach 1-2 Tagen befinden sich bereits hyaline Membranen in den Alveolen und Mikrothromben aus Fibrin, Thrombozyten oder Fettembolien in den Kapillaren (Leutz et al., 1999).

Im chronischen Stadium führen Ödem, Fibrosierung und Zellproliferation zu einer progressiven Verdickung von Endothel, Epithel und Interstitium. Die Pneumozyten Typ II differenzieren sich nicht mehr in Pneumozyten Typ I, wodurch nicht mehr genügend Surfactant zur Verfügung steht, und folglich die Oberflächenspannung nicht mehr herabgesetzt wird (Leutz et al., 1999). Die hohe Wandspannung in den Alveolen führt zur Entstehung von Mikroatelektasen, die zu intrapulmonalen Rechts-Links-Shunts mit Hypoxie führen (Bernard et al., 1994). Durch die verlängerte Diffusionsstrecke der Alveolargefäße wird die Perfusion verschlechtert und es kommt zur respiratorischen Insuffizienz. Eine komplette Erholung ist ab dieser Phase kaum noch möglich (Greer, 2010a). Die pulmonale Compliance wird herabgesetzt und die funktionale Residualkapazität nimmt ab. Eine Erhöhung des Lungengefäßwiderstandes führt zu einem Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (Leutz et al., 1999).

Die funktionierende Gasaustauschfläche der Lunge wird durch das Ödem und den Gewebeumbau, der gelegentlich zu einer Fibrosierung mit dennoch recht guter Prognose führen kann, meist passager stark verkleinert. Beim schweren ARDS macht sie nur noch ca. 20-30% der gesamten Fläche aus (Bachofen & Weibel, 1977). Sowohl das Acute Lung Injury (ALI) als auch seine schwere Form, das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) sind wie in 2.5.1 erklärt durch einen diffusen transmuralen (endothelialen und epithelialen) Alveolarwandschaden gekennzeichnet. Es kommt hierbei zu einem starken Epithelzellschaden und -zelltod (Matute-Bello et al., 1999). Auch ein pulmonaler Endothelzelltod und eine Dysfunktion des pulmonalen Gefäßnetzwerkes scheinen hierbei typisch zu sein. Es kommt zu vaskulären Läsionen in großen Pulmonalarterien (Tomashefski et al., 1983), und bis die Hälfte aller Lungenkapillaren werden bei ARDS defekt (Bachofen et al., 1977; Tomashefski et al., 1983). Bachofen und Weibel verdeutlichen 1977 diesen Endothelzelltod und Kapillaruntergang mithilfe von elektronenmikroskopischen Studien (Bachofen et al., 1977). Im Verlauf zeigen auch Tiermodelle den endothelialen Zelltod, z.B. durch Studien, in denen es zu einem akuten Lungenschaden nach LPS-Injektion kommt (Fujita et al., 1998; Kawasaki et al., 2000). Der schwere Gewebeschaden, der bei einer Acute Lung Injury oder Acute Respiratory Distress Syndrom auftritt, führt vermutlich zu einer inflammatorischen Antwort und zu Reperaturprozessen, die wiederum eine weitere Apoptose oder Nekrose von Endothel- oder Epithelzellen bedingen (Fujita et al., 1998; Kawasaki et al., 2000; Kitamura et al., 2001; Rafii, 2000).

Bestimmte Areale werden geschädigt, andere nicht. Nach Gattinoni wird die Lunge in gesunde und kranke Areale eingeteilt. Innerhalb der Zone mit gesunder Lunge, funktioniert diese ohne Einschränkungen. In der restlichen Lunge gibt es nun zwei verschiedene Bereiche. Es existieren Flächen, wo im Prinzip noch gesunde Alveolen kollabiert und atelektatisch sind. Diese können durch eine maschinelle Beatmung mit PEEP wieder am Gasaustausch teilnehmen. Anders hingegen ist es bei den Shunt-Arealen, in denen durch alveoläre/vaskuläre Okklusionen ein alveolärer Totraum existiert. Hier kann auch eine maschinelle Beatmung keinen Gasaustausch mehr ermöglichen.

2.6 Readouts bei akutem Lungenschaden

Welche Endpunkte können überhaupt bei einem akuten Lungenschaden gemessen werden? Wenn wir von der Definition des ARDS ausgehen, erscheint die Gasaustauschstörung ein zentraler Parameter des akuten Lungenschadens zu sein. Entsprechend ist die $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, also das Verhältnis des Sauerstoff-Partialdruckes in Relation zur Fraktion des inspirierten Sauerstoffs, ein solches Maß. Weiter können auch Parameter der Lungenmechanik über das Ausmaß des Lungenschadens Auskunft geben, und in der Tat wird zum Teil auch die pulmonale Compliance nicht nur in der Klinik, sondern auch im Nagerversuch bestimmt. Als weitere Parameter können Messparameter des Permeabilitätsödems wie das Nass-Trockengewicht der Lunge bestimmt werden: Wird eine Lunge mit Lungenschaden gewogen und dann mehrere Tage in einem Ofen bei recht hoher Temperatur (60-80°C) getrocknet, so kann das Gewicht vorher und nachher, also das Nass-Trockengewicht bestimmt werden. Auch können Kapillarschranken-Dichten-Bestimmungen als Ausmaß des Lungenschadens durchgeführt werden, mit radioaktiven Tracern wie Jod 125-Albumin oder Jod 131-Albumin, das nach Freiperfusion der Lunge von Blut bei der Sakrifizierung des Tieres dann Ausmaß des Ödems ist. Gleichmaßen kann mit Farbstoffen wie Evans-Blau aus dem Homogenat der Lunge oder mit Fluoreszenz-Farbstoffen wie FITC-gelabeltem Albumin solch eine Bestimmung durchgeführt werden.

Auch morphologische Kriterien können zur Quantifizierung eines akuten Lungenschaden benutzt werden. So werden zum Teil Scores bei histologischen Schnitten für die beobachtbaren Strukturveränderungen wie Leukozyteninfiltration, Septen-Ödem im Sinne der Septendicke, Ausmaß des alveolären Infiltrates und alveolären proteinreichen Ödems etc. verändert. Wird dies noch strukturierter, z.B. mittels „unbiased stereology“, also mit Methoden der strukturierten Sammlung von Stichproben von Gewebe in der Lunge durchgeführt, können sehr genaue quantitative Angaben zum Lungenschaden gemacht werden.

Auch können heute mit modernen bildgebenden Verfahren (Bsp: Mikro-CT für Mäuse / Nager) teils intravital, teils erst bei Sakrifizierung Lungenschäden quantifiziert werden.

2.7 Stamm- und Progenitorzellen: Was sind das?

Die heutige Medizin ist einem ständigem Wandel unterworfen. Im Laufe der letzten Jahrzehnte konnten Infektionen und maligne Tumore immer besser behandelt werden. Nichts desto trotz sind weitere Fortschritte nötig. Besonders im Bereich der Reparatur von beschädigten Organen fehlen Behandlungsmöglichkeiten. Aus diesem Grund ist die Transplantation solider Organe immer wichtiger geworden. Doch sind mit ihr viele Schwierigkeiten verbunden. So muss das richtige Mittelmaß zwischen Abstoßungsreaktion und Tumorwachstum gefunden werden, der Pool an Spenderorganen ist stets sehr limitiert, und es ist bisher nicht möglich, eine gute Langzeitprognose abzugeben.

Die gegenwärtige Forschung beschäftigt sich zunehmend mit der regenerativen Medizin, der Medizin, die das Ziel hat, geschädigte Organe mit Stamm- und Vorläuferzellen zu heilen, und dem Tissue Engineering (Slayton & Spangrude, 2004). Tissue Engineering ist eine Wissenschaft, die das Ziel hat, menschliche und tierische Gewebe oder zumindest deren Funktion durch biotechnologische Methoden nachzuahmen. Beide Gebiete sind jedoch noch in den Anfängen der Erforschung. Als Quellen für die Regeneration der Organe dienen embryonale und adulte Stammzellen sowie aus ihnen genetisch veränderte Zellen. Die Verwendung von embryonalen Stammzellen ist durch zusätzliche ethische und gesetzliche Regeln eingeschränkt (Slayton et al., 2004). Durch die Verwendung von adulten Stammzellen können diese Limitationen vermieden werden. Bis vor kurzem war man der Überzeugung, dass adulte Stammzellen lediglich in der Lage sind, das Gewebe hervorzubringen, aus dem sie entstammen. Diese Ansicht ist mittlerweile überholt, und man weiß, dass adulte Stammzellen sich auch in andere Gewebe, aus denen sie nicht abstammen, differenzieren können, also „plastisch“ sind. Plastizität oder Transdifferenzierung stehen für das Annehmen eines unerwarteten Phänotyps in einer bestimmten Zelllinie. Wenn sich z.B. aus einer hämatopoetischen Stammzelle zunächst Progenitoren, dann Präkursoren und letztendlich Erythrozyten oder Granulozyten differenzieren, ist das normal. Unnormal oder zumindest unerwartet ist jedoch, wenn diese hämatopoetische Stammzelle sich in einen Kardiomyozyten differenziert. Dieser Vorgang nennt sich Transdifferenzierung. Die Transdifferenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu Kardiomyozyten ist erst einmal gezeigt worden (Orlic, 2002), obwohl es bis zu diesem Zeitpunkt angezweifelt wird.

Zelluläre Fusion heißt, dass zwei unterschiedliche Zellen ein Hybrid bilden. Das Reifen dieses Hybrids ist dabei hauptsächlich vom Kern der undifferenzierteren Zelle verur-

sacht, während der Phänotyp eher durch die differenziertere Zelle festgelegt wird (Anversa, Leri, & Kajstura, 2006).

Aufgrund der Tatsache, dass hämatopoetische Stammzellen sich nach der Injektion kaum in Kardiomyozyten differenzieren und die Hybridzellen sich nicht nennenswert proliferieren, ist eine Bearbeitung der Stammzellversuche zugunsten der myokardialen Funktion notwendig. Diese Zellen sollten nach Möglichkeit andere Funktionen erfüllen, wie die Festigung einer infarzierten Myokardregion. Ein anderer „parakriner“ Effekt wäre eventuell durch eine verbesserte Durchblutung z.B. durch Produktion von lokalen Signalmolekülen erreichbar und könnte so das Absterben von Kardiomyozyten verhindern (Murry, Reinecke, & Pabon, 2006). Durch die Injektion des zellfreien Überstandes aus der Kultur konnte ebenfalls das Resultat transplanteder mesenchymaler Stammzellen erreicht werden (Gnecchi et al., 2005; Gnecchi et al., 2006). Bis dato konnte keine Lösung gefunden werden, neues und schlagendes Myokard im Infarktareal zu produzieren. Es gibt dennoch Aussicht auf neue Therapieansätze mit dem Hinblick darauf, dass die Zelltherapien die Funktionalität des Organs verbessern (Gnecchi et al., 2005; Laflamme & Murry, 2005; Murry, Field, & Menasche, 2005).

Durch die Plastizität der adulten Stammzellen wäre es grundsätzlich möglich, Knochenmarkstammzellen zur Reparatur geschädigter Kardiomyozyten infolge eines ischämischen Schadens, pankreatische Inselzellen zur Besserung eines insulinabhängigen Diabetes mellitus oder Stammzellen zur Verbesserung der Substantia nigra bei einem Morbus Parkinson zu benutzen. Diese enorme Plastizität von Stamm- und Vorläuferzellen ist vermutlich die Reversion in ein Stadium, das dem embryonalen Stammzellen vergleichbar ist (Wei, Schubiger, Harder, & Muller, 2000). Diese Annahme setzt voraus, dass ein differenziertes Stadium dieser Zellen reversibel sein kann (Blau, Brzelton, & Weimann, 2001). Weiterhin unklar ist hierbei, ob diese Zellen, die eine neue Aufgabe übernommen haben, dieser ausreichend lange nachgehen, oder ob sie sich verfrüht in ihr Ausgangsgewebe zurückverwandeln. Auch Zellen in Geweben haben mehr Fähigkeiten als bisher angenommen. So ging man vorerst davon aus, dass Hautstammzellen uni- oder bipotent sind, doch dann erkannte man, dass sie auch multipotente Progenitorzellen beinhalten können (Liang & Bickenbach, 2002; Sell, 2006).

Beim Blick in die Tierwelt fällt bei einigen primitiven Organismen wie Planarien, Hydra, Mollusken, Insekten, Crustacea und bei Sternfischen die Regeneration von Extremitäten und auch Organen ins Auge. Auch Amphibien wie Frösche und Salamander besitzen die Fähigkeit z.B. Extremitäten zu regenerieren. Um diesen Vorgang vollziehen zu können, dedifferenzieren sich die Zellen in den zu reparierenden Geweben. Man nennt sie dann „Regenerationsblastem“, und sie können vermutlich die Vorgänge wiederholen, die in der Embryogenese abgelaufen sind, um das Gewebe aufzubauen (Slayton

et al., 2004). Sie sind allerdings nicht pluripotent, denn sie regenerieren das Gewebe, aus dem sie entstammen. Wenn z. B. Zellen aus der Extremität in ein Auge transplantiert werden, so entspringen im Auge Extremitätenanteile. Diese Verläufe bilden einen wichtigen Ausgangspunkt für das Ergründen der Geweberegeneration.

Durch die Tatsache, dass die Lunge seriell in den Blutkreislauf geschaltet ist und ein hohes Minutenvolumen hat, hat sie eine fast genauso große endotheliale Oberfläche wie die Alveolarfläche (Weibel et al., 1988). Endothelzellen haben folgende Funktionen: Sie regulieren den Transport von Nutrienten und Mediatoren, die Adhäsion von Immunzellen, inflammatorischen und anderen Zellen (eventuell auch von zirkulierenden Tumorzellen), den vaskulären Tonus, die Dichte und die Selektivität der Barriere zwischen Blut und Interstitium (Lin et al., 2000). Bei den unterschiedlichsten pathophysiologischen Zuständen, wie Entzündung, Angiogenese oder Hämostase spielen Endothelzellen eine wichtige Rolle (Rafii, 2000).

Das Acute Lung Injury (ALI) und das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), seine schwere Form, sind durch einen diffusen transmuralen (also endothelialen und epithelialen) Alveolarwandschaden gekennzeichnet, bei dem es zu einem schweren Epithelzellschaden und -zelltod kommt (Matute-Bello et al., 1999). ALI und ARDS gehen meist mit einem pulmonalen Endothelzelltod und Dysfunktion des pulmonalen Gefäß-Netzwerkes einher. Es kommt zu vaskulären Läsionen in großen Pulmonalarterien (Tomashefski et al., 1983) und bis zur Hälfte der Lungenkapillaren bei ARDS werden eingebüßt, wie man elektronenmikroskopisch darstellen kann (Bachofen et al., 1977). Auch in Tierstudien, bei einem akuten Lungenschaden nach LPS-Injektion, war der endotheliale Zelltod deutlich erkennbar (Fujita et al., 1998; Kawasaki et al., 2000). Im Rahmen des schweren Gewebeschadens von ALI und ARDS kommt es zu einer akuten inflammatorischen Antwort und nachfolgenden Reparaturprozessen, die zu weiterer Apoptose oder Nekrose von Endothel- oder Epithelzellen führen können (Fujita et al., 1998; Kawasaki et al., 2000; Kitamura et al., 2001; Rafii, 2000).

Während sich reife Endothelzellen als einschichtige Zelloberfläche in adulten Gefäßen befinden, vermutet man, dass EPC durch spezifische inflammatorische Reize oder Schädigungen stimuliert werden und dadurch aus dem Knochenmark in das periphere Blut ausschwemmen (Bull et al., 2003; Rafii, 2000). Man geht davon aus, dass die vaskulären Endothelzellen ihren Ursprung im Knochenmark haben und dass aus dem Hämangioblast, einer hämatopoetischen Stammzelle die endotheliale Progenitorzelle hervorgeht (Choi, Kennedy, Kazarov, Papadimitriou, & Keller, 1998; Shi et al., 1998). Nach einer Einzelzelltransplantation einer hämatopoetischen Stammzelle (Lin⁻, Sca-1⁺, c-Kit⁺) in eine Maus kommt es daher zur Rekonstitution des hämatopoetischen Systems und zu einer Blutgefäßregeneration (Grant et al., 2002). Infolgedessen besit-

zen die adulten hämatopoetischen Stammzellen die Fähigkeit, sich klonal in alle hämatopoetischen Zelllinien, also auch in Endothelzellen, zu teilen und haben eine funktionale Hämangioblast-Aktivität (Grant et al., 2002). Speziell die Mobilisation von EPC, hier als CD133+, CD34+ und VEGFR2+ sowie VE-cadherin+ definiert, ist als Folge von vaskulären Insulten wie aortokoronaren Bypassoperationen oder Gewebetrauma und Ischämie bei Verbrennungen festzustellen (Gill et al., 2001b). Man hat dabei ein Ansteigen der EPC um das 50fache und eine Normalisierung binnen 48-72 Stunden sehen können. Zeitgleich fielen VEGF-Plasmaspiegel und andere Botenstoffe auf, die wahrscheinlich mit dem EPC-Anstieg verbunden sind (Gill et al., 2001b).

Stammzellen werden im Knochenmark gebildet, sie haben die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und sich bei Bedarf uneingeschränkt und undifferenziert zu vermehren. Sie können Tochterzellen produzieren und Gewebe erneuern.

In der Embryogenese bildet der Zellhaufen der Blastozyste drei primäre Keimbahnen: Endoderm, Mesoderm und Ektoderm. Aus diesen drei Keimblättern entwickeln sich später alle fetalen Anlagen (Neuringer & Randell, 2004).

Man differenziert bei den Stammzellen zwischen:

- Totipotenz: Fähigkeit, die plazentazugehörige Trophoblastenhülle zu generieren und einen vollständigen Embryo zu formen,
- Pluripotenz: Die embryonalen Stammzellen können außer der Trophoblastenhülle sämtliche Zellarten bilden und
- Omnipotenz: Die omnipotenten Stammzellen haben die Fähigkeit, alle gewebsspezifischen Zellen eines Organverbandes zu erneuern.

West und Daley variierten die Kulturbedingungen in embryonalen Stamm- und Keimzellen in ihren Versuchen durch die Zugabe eines Differenzierungs-Inhibitors (leukemia inhibitory factor) und erreichten damit die Konservierung der Pluripotenz der Stammzellen. Embryonale pluripotente Zellen haben theoretisch eine nahezu unbegrenzte therapeutische Vielfalt (Neuringer et al., 2004; West & Daley, 2004).

Auf der einen Seite sind die Gewinnung und die Verwendung von embryonalen Stammzellen ethisch und gesetzlich streng limitiert, andererseits ist die weitere Erforschung der Stammzellen sehr wichtig im Hinblick auf das hohe therapeutische Potenzial und die vielen offenen Fragen, wie Oberflächenstruktur und Histokompatibilität, Gewinnung der Stammzellen und Kulturbedingungen (Khakoo & Finkel, 2005; Sylvester & Longaker, 2004; Donovan & Gearhart, 2001a).

Eine hohe Tumorbildungsrate der embryonalen Stammzellen könnte jedoch eine wesentliche Einschränkung ihrer Anwendung darstellen (Mailänder, Rojewski, Burkhart, Körper, & Schrezenmeier, 2005).

Lange Zeit war man der festen Meinung, dass adulte Stammzellen vorwiegend für die Erhaltung der Zellpopulation in erwachsenem Gewebe, für Selbsterneuerung und für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase zuständig sind. Außerdem dachte man, dass die terminale Differenzierung einer Stammzelle zur Gewebszelle linear einem vorgegebenen Weg folge und irreversibel sei.

Aktuellere Forschung widerlegt dieses grundsätzliche Verständnis adulter Stammzellen. Die Ergebnisse zeigten, dass das Knochenmark nicht allein „Zellspeicher“ für Stammzellen der Hämatopoese ist, sondern auch Ausgangspunkt von Progenitorzellen (Krause, 2002), die sich *in vivo* vor allem zu Endothelzellen (Asahara et al., 1997; Rafii et al., 1995; Yamada et al., 2004), in geringerem Maß zu Epithelzellen (Abe et al., 2004; Kotton et al., 2001; Krause et al., 2001; Okamoto et al., 2002; Spencer et al., 2005; Suratt et al., 2003; Yamada et al., 2004), mesenchymalen Stammzellen (Rochefort et al., 2005; Sata et al., 2002), Hepatozyten (Lagasse et al., 2000), gestreiften (Ferrari et al., 1998), glatten (Hillebrands et al., 2001) und Herzmuskelzellen (Orlic et al., 2001), sowie Fibroblasten, Myofibroblasten (Epperly, Guo, Gretton, & Greenberger, 2003; Pereira et al., 1995) und Nervenzellen (Eglitis & Mezey, 1997; Mezey, Chandross, Harta, Maki, & McKercher, 2000) differenzieren.

Was die o.g. Differenzierung der Stamm- zu Körperzellen anbelangt, so zeigen neuere Daten, dass sich nicht nur neuronale, sondern auch Muskelzellen (Jackson, Mi, & Goodell, 1999) in Blutzellen zurückverwandeln können (Bjornson, Rietze, Reynolds, Magli, & Vescovi, 1999).

2.8 Bedeutung endothelialer Progenitorzellen, zirkulierender endothelialer Progenitorzellen und zirkulierender Endothelzellen

Endotheliale Progenitorzellen können sich im Gegensatz zu ausgereiften Endothelzellen gut proliferieren (Bompais et al., 2004) und besitzen die Fähigkeit, zu geschädigten, traumatischen oder ischämischen Endothel zu migrieren und dort eine Reparatur oder Erneuerung des Gefäßes zu veranlassen (Bompais et al., 2004; Espinosa-Heidmann, Caicedo, Hernandez, Csaky, & Cousins, 2003; Hu, Davison, Zhang, & Xu, 2003; Park et al., 2004; Sata, 2003; Werner et al., 2003; Xu, Zhang, Davison, & Hu, 2003; Yamada et al., 2004). Reife Endothelzellen, die im Blut zirkulieren, werden als Zellen, die sich nach einem vaskulären Insult aus der Gefäßwand herauslösen und keine wichtige reparierende Funktion haben, aufgefasst. Eine Vielzahl von zirkulierenden EPC ist verbunden mit einer guten vaskulären Funktion, mit verminderten kardiovaskulären Risikofaktoren (Heiss et al., 2005; Hill et al., 2003) und geringeren Todesraten (Werner et al., 2005). Insofern werden zirkulierende und funktionierende EPC als Reparaturzellen des vaskulären Bettes angesehen (Blann et al., 2005; Kubo, 2005). Bei einem akuten Myo-

kardinfarkt beobachtet man an Tag 7 einen Anstieg der endothelialen Progenitorzellen ca. um den Faktor 3 (Shintani et al., 2001b). Neue Studienergebnisse lassen vermuten, dass Patienten mit einem akuten Lungenschaden, die viele zirkulierende EPC besitzen, eine bessere Überlebenszeit haben als Patienten mit weniger zirkulierender EPC (Burnham & Moss, 2006; Burnham et al., 2005). Bei Pneumoniepatienten stellt man ebenfalls eine erhöhte Zahl an zirkulierenden EPC fest (Yamada et al., 2005). Bei radiologischen Kontrollen fällt auf, dass „fibrotische“ Veränderungen gehäuft bei Patienten mit wenig zirkulierenden EPC auftreten. Man geht davon aus, dass die zirkulierenden EPC eine wichtige Funktion in der Reparatur eines Gewebeschadens, der durch eine Pneumonie zustande gekommen ist, haben (Yamada et al., 2005). Bei gesunden erwachsenen Menschen ist die Zahl der zirkulierenden EPC klein (Mancuso et al., 2001; Powell et al., 2005), sie variiert jedoch erheblich mit der angewandten Bestimmungstechnik und dadurch auch mit der Definition dieses Zelltyps (Blann et al., 2005). Die endothelialen Progenitorzellen sind im Nabelschnurvenenblut scheinbar dreimal so viel vorhanden wie im peripheren Blut.

Bei Bedarf wird im Körper Gewebe ersetzt. Dies kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen. Eine Möglichkeit ist, dass differenzierte Zellen durch neu generierte Populationen von Zellen abgelöst werden, die von einem bestehenden Pool von Stammzellen abstammen. Dies ist z. B. charakteristisch für Blutzellen. Hier entstehen hämatopoetische Vorläuferzellen aus wenigen, sich regelmäßig selbst erneuernden Stammzellen („asymmetrische Teilung“) mithilfe einer regulierten Differenzierung und den entsprechenden Zytokinen oder Wachstumshormonen, wobei bestimmte Zelllinien vorhanden sind (Asahara & Isner, 2004). Bei dem Gewebeersatz in der Lunge ging man in der Vergangenheit davon aus, dass die abgestorbenen Zellen allein aus der Umgebung des Schadens innerhalb des gegebenen Gewebes und unter Umständen durch lungenresidente Stammzellen - die Organstammzellen - ersetzt werden (Kim, Lee, Lee, & Ro, 2005). Dementsprechend können z. B. multipotente Stammzellen des Tracheobronchialepithels in Stammzellnischen längs der Bronchien, außerdem häufig in der Nähe von neuroendokrinen Zellen und distal am bronchoalveolären Übergang, das umfassende respiratorische Epithel wieder aufbauen (Giangreco, Shen, Reynolds, & Stripp, 2003; Hong, Reynolds, Watkins, Fuchs, & Stripp, 2004c; ten Have-Opbroek, Randell, & Stripp, 2004). Nach unserem Wissen entstehen Alveolarepithelzellen, also Pneumozyten Typ I aus Typ II Pneumozyten (Fehrenbach et al., 1995). Und die bevorzugte Verteilung der Pneumozyten Typ II in der adulten Lunge als Zell-Cluster verstärkt die Hypothese von entsprechenden Typ II-Stammzell-Nischen (ten Have-Opbroek et al., 2004). Eine zweite Möglichkeit, Gewebe zu ersetzen, sind die aus dem Knochenmark stammenden Stammzellen und Progenitorzellen, die scheinbar in der Lage sind,

sich zu den Zellen zu differenzieren, die am Ort der Schädigung zur Reparatur gebraucht werden (Rafii, 2000; Springer, Brazelton, & Blau, 2001; Yamada et al., 2004).

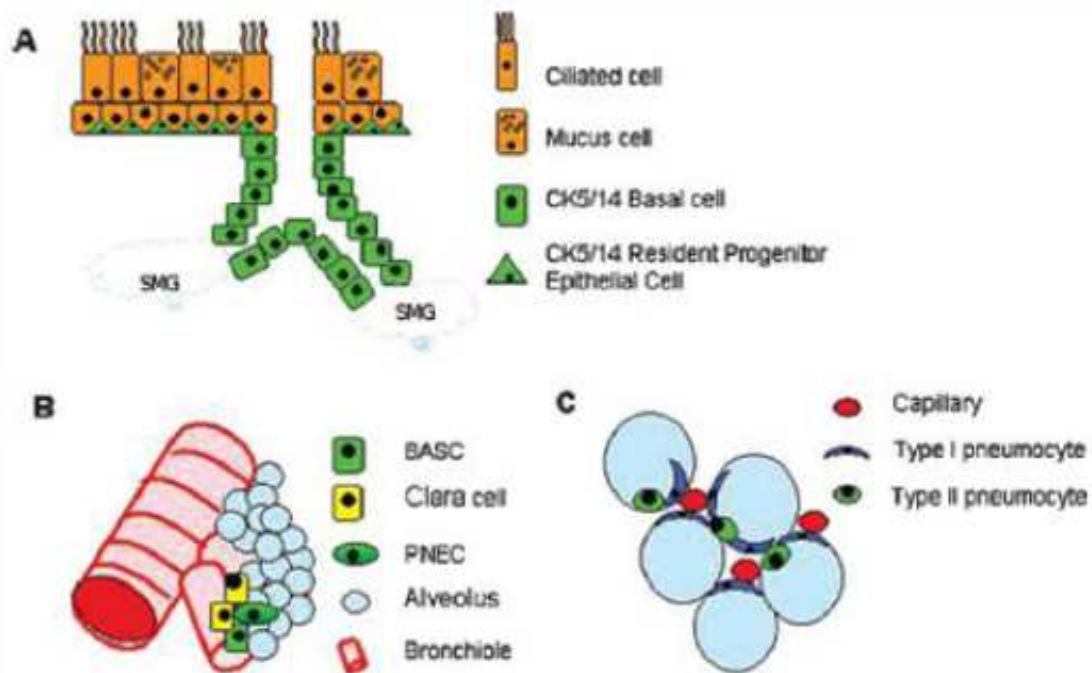


Abbildung 1: Residente Stammzellpopulationen in der Lunge.

A. In den proximalen Luftwegen sind basale und parabasale Zellen in submukösen Drüsen (submucosal gland, SMG) und Drüsengängen, definiert als Cytokeratin 5/14 positiv die am meisten proliferierenden Zellen, die sich mit dem Proliferationsmarker Ki67 färben. Analog zur Haut sind somit diese Zellen transient amplifizierende Zellen, die morphologisch nicht von unidentifizierten primitiven Stammzellen in den proximalen kartilaginösen Atemwegen unterscheiden (Boers, Ambergen, & Thunnissen, 1998). Weitere Arbeiten ergeben ähnliche Befunde (Borthwick, Shahbazian, Todd Krantz, Dorin, & Randell, 2001; Duan, Sehgal, Yao, & Engelhardt, 1998; Engelhardt, Schlossberg, Yankaskas, & Dudus, 1995; Hong, Reynolds, Watkins, Fuchs, & Stripp, 2004a; Hong, Reynolds, Watkins, Fuchs, & Stripp, 2004b; Schoch et al., 2004).

B. Bronchoalveoläre Stammzellen (BASC) sind gegenüber Naphthalen-Schädigung resistente Zellen an den bronchoalveolären Duktübergängen. Sie exprimieren Clara Cell Secretory Protein (CCSP) wie auch Surfactant-Protein C (SP-C), sind Sca-1⁺, CD34⁺, CD45⁺ und PECAM⁺. Sie können sich selbst erneuern und in Clara-like-Zellen und in Typ II-Alveolarzellen in vitro differenzieren. Pulmonale neuroendokrine Zellen (PNEC) werden verstanden als Zellen, die partiell die Luftwege nach schweren Schäden mit Verlust der Clara-Zellen repopularisieren (Kim et al., 2005; Reynolds et al., 2000; Reynolds, Giangreco, Power, & Stripp, 2000; Reynolds et al., 2004).

C. Typ II-Pneumozyten bzw. bei Lungenschäden sehr stabile E-Cadherin-Subpopulationen mit gutem Proliferationspotential und hoher Telomeraseaktivität (Danto, Shannon, Borok, Zabski, & Crandall, 1995) werden als die klassischen Progenitoren der distalen Luftwege betrachtet, indem sie sich selber erneuern und sich aus ihnen Typ I-Pneumozyten entwickeln können (Adamson & Bowden, 1974; Adamson & Bowden, 1975; Evans, Cabral, Stephens, & Freeman, 1975).

Details zu den Charakteristika von residenten Stamm- und Progenitorzellen in der Lunge sind in einer neuen Übersichtsarbeit dargestellt (Gomperts & Strieter, 2006).

Seit einigen Jahren gehen Wissenschaftler vom Knochenmark als eine bekannte Quelle von Progenitorzellen unterschiedlichster Zelltypen aus (Krause, 2002), darunter Endothelzellen (Asahara et al., 1997; Rafii, 2000; Yamada et al., 2004), Epithelzellen (Abe et al., 2004; Kotton et al., 2001; Krause et al., 2001; Okamoto et al., 2002; Spencer et al., 2005; Suratt et al., 2003; Yamada et al., 2004), Typ I-Pneumozyten

(Kotton et al., 2001), Typ II-Pneumozyten (Krause et al., 2001), mesenchymale Stammzellen (Jiang et al., 2002; Rochefort et al., 2005; Sata et al., 2002), Hepatozyten (Lagasse et al., 2000; Petersen et al., 1999), kardiomyozytäre (Orlic et al., 2001), gestreifte (Ferrari et al., 1998) und glatte Muskelzellen (Hillebrands et al., 2001), Fibroblasten oder Myofibroblasten (Epperly et al., 2003; Pereira et al., 1995) und Neuronen (Eglitis et al., 1997; Mezey et al., 2000). Es wird spekuliert, dass mögliche pluripotente Stammzellen (sich in alle Körperzellen differenzierende Stammzellen) aus dem adulten Knochenmark genauso viel Potenzial haben wie embryonale Stammzellen (Gunsilius, Gastl, & Petzer, 2001). Die Vorstellung, dass Alveolarepithelzellen, die aus Typ II-Pneumozyten entstehen, aus dem Knochenmark wiederhergestellt werden, ist gegenwärtig umstritten (Kotton, Fabian, & Mulligan, 2005). Man vermutet, dass ein entscheidender Teil der Reparatur durch Typ II-Pneumozyten nicht durch Zellen aus dem Knochenmark fabriziert wird, sondern aus den lokalen Stammzell-Nischen stammt (Zander et al., 2005; Zander, Cogle, Theise, & Crawford, 2006). Die Mehrzahl der Wissenschaftler ist davon überzeugt, dass Pneumozyten Typ II aus dem Knochenmark ins Gewebe wandern können.

In Bezug auf die Plastizität der Typ II-Pneumozyten erwartete man früher von dieser Zelle nur eine epitheliale Differenzierung. Mittlerweile deuten unterschiedliche Studien auf eine unter TGF- β 1 induzierte epithelial-mesenchymale Transition der Typ II-Zelle, eventuell auch der Typ I-Zelle hin, also eine Differenzierung zu einer mesenchymalen Zelle, und schließlich zum Fibroblasten (Zavadil & Bottinger, 2005). Diese Vorstellung ist aus Nieren-Fibrosemodellen abgeleitet und bei embryonalem Gewebe akzeptiert. Im adulten Gewebe bei Lungenfibrose ist dieses Konzept zwar auch wichtig, aber noch umstritten (Kalluri & Neilson, 2003). Bei den Nierenfibrosemodellen vermutet man, dass von den Fibroblasten, die durch eine Krankheit entstehen, mehr als ein Drittel aus dem lokalen renal-tubulären Epithel stammen (Kalluri et al., 2003), 15% aus dem Knochenmark und ungefähr die Hälfte aus nicht deutlich geklärten Orten. Gegenstand der Untersuchungen ist die Frage, woher Fibroblasten grundsätzlich herkommen. Die Annahme, dass Fibroblasten „mesenchymale Zellen“ sind, wurde verworfen aufgrund der Tatsache, dass Mesenchymzellen kein Fibroblastenspezifisches Protein 1 (FSP1) exprimieren. Eine weitere Theorie besagt, dass unter Umständen alle Fibroblasten aus einer epithelial-mesenchymalen Transition entstammen, weshalb vielleicht die zirkulierenden Fibroblasten oder ihre Vorläufer, die wir möglicherweise Fibrozyten nennen müssen, aus endostalem Epithel stammen würden. Es ist folglich noch nicht bekannt, welche Verbindung mesenchymale Stamm- und Vorläuferzellen und Fibroblasten haben (Kalluri et al., 2003).

Mesenchymale Stammzellen spielen wahrscheinlich nicht nur für die Reparatur, sondern auch für die Pathogenese der Fibrose eine entscheidende Rolle in der Lunge. Mesenchymale Stammzellen haben eine Morphologie, die den Fibroblasten sehr ähnelt, sie wachsen adhärent und können sich in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten entwickeln. Man vermutet, dass eine Dysregulation der mesenchymalen Stammzellen bei akutem Lungenschaden zu einer falsch weiter geleiteten Reparatur führen könnte, die sich durch einen persistierenden Gewebeüberschuss ausdrückt (Horowitz et al., 2006).

Die zirkulierenden mesenchymalen Stammzellen stammen aus dem Knochenmark und heißen Fibrozyten. Sie besitzen sowohl Marker von den Leukozyten als auch von mesenchymalen Zellen (Moore et al., 2005). Es sieht so aus, als wären die Fibrozyten bei der z.B. durch Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)-induzierten Lungenfibrose involviert, da die experimentelle Inhibition ihrer Rekrutierung in der Maus zu verminderter Lungenschädigung führt. Die Aufgaben von Fibrozyten bei der Lungenfibrose werden durch ihre Fähigkeit, sich zu Myofibroblasten zu differenzieren, ihrer Rolle bei fibrosierenden Prozessen wie Asthma, nephrogener fibrosierender Dermopathie und hypertropher Narbenbildung deutlich (Moore et al., 2005). Fibrozyten können fibrogen sein aufgrund ihrer Kollagensekretion, ihrer Freisetzung von TGF- β 1, ihrer Aktivierung residenter Fibroblasten und ihrer eigenen Differenzierung zu Fibroblasten, wodurch sie darauf CCR2 verlieren. Dies kann ein Nachteil für die Zelle sein, da sie dann über keinen Migrationsstimulus mehr verfügt, wenn sie z. B. in einem geschädigten Gewebe ist (Moore et al., 2005). Es wird momentan vermutet, dass im Blut ca. 1% der mikroskopisch als Monozyten definierte Zellen Fibrozyten sind.

Beim Krankheitsbild Asthma versucht man auszumachen, woher die Myofibroblasten in so kurzer Zeit von wenigen Stunden entstammen, sprich ob sie aus der glatten Muskulatur des Luftweges im Rahmen einer plastischen Veränderung, aus dem Knochenmark oder möglicherweise aus dem Pool der Fibrozyten generiert werden (Nihlberg et al., 2006; Quan, Cowper, & Bucala, 2006; Schmidt, Sun, Stacey, Mori, & Mattoli, 2003; Stewart, 2004). Auch hier untersucht man, ob regenerative Zellen aus der Umgebung und dem Knochenmark eine wichtige Funktion übernehmen.

Aus embryonalen Stammzellen konnten Zellen mit spezifischer Expression von Surfactantproteinen differenziert werden (Ali et al., 2002). Diese können sich wiederum in bronchiale, bronchioläre und alveoläre Zellen weiterentwickeln (Ali et al., 2002; Coraux et al., 2005; Samadikuchaksaraei et al., 2006; Samadikuchaksaraei & Bishop, 2006). Die Stammzellen sind für das Verständnis von Gewebereparatur zwar wichtig (Papaioannou & Hadjantonakis, 2004; Rathjen & Rathjen, 2004), dabei aber therapeu-

tisch zunächst ohne Bedeutung, da sie zu unkontrolliertem Wachstum neigen und dadurch gegebenenfalls auch zu Tumoren führen können.

Derweil werden ständig neue Therapieansätze mit adulten Stamm- und Progenitorzellen in unterschiedlichen klinischen Situationen entwickelt (Assmus et al., 2002; Strauer et al., 2002; Tateishi-Yuyama et al., 2002; Wollert et al., 2004). Die Fähigkeit von endothelialen Progenitorzellen, im Blut zu zirkulieren und sich in die Organe einzunisten, wird fast nicht mehr in Frage gestellt (Asahara et al., 1997; Hill et al., 2003).

Die Anzahl und Funktion endothelialer Progenitorzellen ist bei Diabetikern herabgesetzt. *In vitro* wurde bei erhöhten Glukosewerten eine niedrigere Proliferation gezeigt. Dieses konnte durch die Inhibition der p38 MAP-Kinase verhindert werden (Kuki et al., 2006). Es wurde eine vermehrte Seneszenz bei 12.5 mmol/l Glukose im Gegensatz zu 5mmol/l und eine geringere mitogene Aktivität gezeigt. Bei Hypertension sowohl in der Ratte als auch im Menschen sind die EPC vermehrt seneszent (Imanishi, Moriwaki, Hano, & Nishio, 2005). Ferner scheinen auch Angiotensin II zusammen mit oxidativem Stress, Evidenz von Peroxynitritbildung und einer Verminderung der Telomeraseaktivität Seneszenz bei EPC zu vermitteln und deren Proliferation zu hemmen (Imanishi, Hano, & Nishio, 2005a). Dennoch aktiviert Angiotensin II in der Zellkultur auch die VEGF-induzierte EPC-Proliferation und erhöht die EPC-Vernetzung *in vitro* im Matrigel-Assay (Imanishi, Hano, Sawamura, & Nishio, 2004). Östrogene sind in der Lage, die durch Angiotensin II induzierte Seneszenz zu inhibieren, partiell durch Downregulation des AT1-Rezeptors (Imanishi, Hano, & Nishio, 2005b).

2003 wurde der Zusammenhang zwischen der Anzahl zirkulierender EPC, der Brachialarterienreaktivität und dem kardiovaskulären Risiko gezeigt (Hill et al., 2003).

Bei der Benutzung von autologen Stammzelltransplantationen, wie dies z. B. in der Kardiologie der Fall ist, stellte man interessanterweise fest, dass autologe Stammzellen auch von älteren Patienten mit dem gleichen Erfolg verwendet werden können (Schannwell, Ott, Brehm, Bartsch, & Strauer, 2006).

EPC können durch unterschiedliche Mechanismen mobilisiert werden. Erythropoietin kann in hoher Dosierung zu solch einer EPC-Mobilisation führen (Prunier et al., 2007), die z. B. bei einem Myokardinfarkt die Größe des Infarktes durch Kardiomyozytenprotektion und durch höhere Kapillardichte verkleinert. Auch Chemotherapie kann scheinbar die Anzahl von EPC erhöhen, wobei bei Brustkrebspatientinnen allerdings auch schon vor der Therapie mehr zirkulierende endotheliale Progenitorzellen im Vergleich zu gesunden Kontrollpatientinnen vorhanden sind (Furstenberger et al., 2006). Im Serum der Patientinnen waren auch VEGF, Erythropoietin und Angiopoietin-2 erhöht, was vermuten lässt, dass durch die Chemotherapie eine pro-angiogene Situation hervorgerufen wird. Auch bei anderen Untersuchungen von Krebspatienten (Beerepoot et al.,

2004; Mancuso et al., 2001) konnten vermehrte EPC zusammen mit dem Tumoraufreten gesehen werden.

Eine Studiengruppe untersuchte den Effekt von Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF) auf EPC. G-CSF erhöht bei koronarkranken Patienten die EPC, die bei diesen um das fünffache abgesunken sind (Heeschen et al., 2004; Powell et al., 2005). Die endothelialen Progenitorzellen steigen sofort um den Faktor 100 an und sinken dann ab, so dass sie nach zwei Wochen noch um das 20fache gegenüber den Anfangswerten erhöht sind (Powell et al., 2005). Sie sind jedoch vermindert funktional, weshalb sie *in vitro* eine schlechte Migrationfähigkeit gegenüber VEGF und Stroma Cell-derived Factor-1 (SDF-1) haben. Ein weiterer Faktor, der wichtig für die Aktivierung von EPC ist, ist Sphingosin-1-Phosphat, das durch ein CXCR4-abhängiges Signaling via den S1P3-Rezeptor arbeitet (Walter et al., 2007). Auch NO scheint wichtig für die Mobilisation von EPC zu sein (Aicher et al., 2003). Klare pro-angiogene Effekte auf kultivierte Endothelzellen haben neben progenitor-aktiven Wachstumsfaktoren auch Erythropoietin, hämatopoetische Wachstumshormone wie soluble Kit-Ligand (sKitL) und Thrombopoietin (Jin et al., 2006a).

Es wird vermutet, dass beim Homing von EPC die $\beta 2$ -Integrine eine bedeutende Funktion haben, obwohl diese sonst vor allem bei der Leukozytenadhäsion wichtig sind (Chavakis et al., 2005; Duan et al., 2006; Springer, 1994a). Des Weiteren wurde beobachtet, dass Selektine auch eine Rolle bei der Adhäsion der EPC einnehmen. Aufgrund dieser beiden Beobachtungen ist es denkbar, dass beim Stammzell-Homing ein analoges Adhärenz bzw. Homing geschehen könnte (Springer, 1994a). Es wird auch davon ausgegangen, dass Integrine wie $\alpha 4 \beta 1$, das Fibronectin und VLA-4 bindet, beim Homing der EPC involviert sind (Duan et al., 2006; Jin et al., 2006b), genauso wie die hämostatischen bzw. thromboaktiven Faktoren wie Plättchen und Fibrin wichtig zu sein scheinen. Das Homing ist beim akuten Lungenschaden mit dem prokoagulativen und antifibrinolytischen Milieu einerseits, aber auch an hinderlichen Orten wie der Alveole selbst und nicht nur im möglicherweise geschädigten Alveolareseptum (de Boer et al., 2006; Langer et al., 2006) vorhanden. Auch die Komplementkomponente C3 und ihre Spaltprodukte C3a, desArgC3a und iC3b dürften in der Stimulation der CXCR4-abhängigen Homing eine Rolle spielen (Ratajczak, Reca, Wysoczynski, Yan, & Ratajczak, 2006). Laut Untersuchungen scheint TNF synergistisch zusammen mit Stromal cell derived Factor-1 (SDF-1) für das Stammzell-Homing zu sein (Schannwell et al., 2006). Inwieweit TNF als wichtigstes Zytokin für eine Mobilisation oder das Homing der EPC bedeutend ist, und welche Vorgänge für die Mobilisierung und Proliferation der endothelialen Progenitorzellen ablaufen, ist weiterhin Gegenstand der Forschung.

Fundamentale Studien aus der Homburger Kardiologie zeigten eine Beeinflussung der EPC durch körperliches Training (Laufs et al., 2004; Laufs et al., 2005). So wurde bei Gesunden die Zahl der EPC durch 30 Minuten Training bei 80% der anaeroben Schwelle mit 2,5 multipliziert, gerade so wie bei 5km/Tag im Laufrad rennenden Mäusen im Vergleich zu normal gehaltenen Mäusen. Nur 10 Minuten Training bei 80% der anaeroben Schwelle rief dabei keine Veränderung der EPC-Zahl hervor. Der stärkste Anstieg war 10-30 Minuten nach der körperlichen Belastung zu beobachten. Ebenfalls die Migrationsfähigkeit der Zellen und die Befähigung, colony forming units zu hervorzurufen, waren durch das Training gesteigert (Laufs et al., 2005). Diese Auswirkung des Trainings war partiell Stickstoffabhängig. Beim Training in einem subkutanen Angiogenese-Modell trat eine 40% gesteigerte Angiogenese auf, was teilweise auf einen antiapoptotischen Effekt für EPC zurückzuführen ist (Laufs et al., 2004).

3 Ziele der Studien

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war, ein leicht reproduzierbares Modell zur Transplantation von Lungengewebe in die Rückenhautkammer der Maus zu etablieren, um damit *in vivo* die Angiogenese und die hämodynamischen Parameter der Lungengefäße näher zu untersuchen. Das Endziel war, an dem bereits analysierten Rückenhautkammermodell mit Lungengewebe einen ischämischen Schaden zu simulieren und unter dieser Konstellation das „Homing“ von endothelialen Progenitorzellen zu studieren. Dabei wurde auf die folgenden fünf Fragestellungen eingegangen:

1. Wie verhält sich ektopes Lungengewebe in der Rückenhautkammer?
2. Wie verhält sich - im Vergleich zum Lungengewebe - Endometriumgewebe in der Rückenhautkammer?
3. Behält das ektope Lungengewebe in der Rückenhautkammer seine hypoxisch-vasokonstriktorisches Eigenschaften?
4. Wie ist ein Ischämie-Reperfusionsschaden in der Rückenhautkammer charakterisiert?
5. Wie „homen“ endotheliale Progenitorzellen in dem Ischämie-Reperfusion-Modell?

3.1 Charakterisierung der Lunge in der Rückenhautkammer

Das erste und grundlegende Ziel für alle weiteren Versuche unserer experimentellen Studie war, ektopes Lungengewebe innerhalb der Rückenhautkammer zu charakterisieren. Die grundlegende Frage war, wodurch die Angiogenese innerhalb ektoper Lungengewebe in der Rückenhautkammer gekennzeichnet ist. Wir wollten ein Modell etablieren, mit dem es möglich ist, die Mikrogefäße des Lungengewebes direkt zu visualisieren und so die Parameter der Angiogenese zu untersuchen. Hierzu implantierten wir syngenes Lungengewebe in die Rückenhautkammer und analysierten deren Anwachsen und Gefäßbildung durch das Intravitalmikroskop über einen Zeitraum von 14 Tagen.

Rückenhautkammern eignen sich allgemein zur intravitalen Mikroskopie der Mikrozyklulation und zur Analyse der Neovaskularisierung z.B. von Granulationsgewebe oder Gewebsimplantaten. So lässt sich diese Technik auch auf Lungengewebe anwenden. Denn die direkte (ohne Benutzung einer Rückenhautkammer) intravitalmikroskopische Untersuchung der Lunge gestaltet sich äußerst schwierig, und entsprechend sind bis-

her nur wenige derartige Studien publiziert. Der Nachteil des Modells der direkten Intravitalmikroskopie der Lunge liegt darin, dass die Mikrozirkulationsanalyse unter mechanischer Beatmung meist bei kurzzeitigem Atemstillstand durchgeführt werden muss, und als Akut-Präparation keine repetitiven Untersuchungen über einen längeren Zeitraum erlaubt. Um diese Nachteile zu umgehen, bot sich das Modell der Rückenhautkammer an, das wir als Grundlage für unsere Studie benutzten. Der Vorzug dieser Methode gegenüber anderen Mikrozirkulationsmodellen ist, dass hier die Bildung neuer Blutgefäße über einen längeren Zeitraum von 2-3 Wochen repetitiv demonstriert werden kann. Durch Analyse mit einem Bildbearbeitungsprogramm können unterschiedliche Parameter der Gefäße ausgewertet werden.

3.2 Vergleich mit Endometrium

Um das Lungengewebe mit einem anderen Organ vergleichen zu können, zogen wir das Endometrium heran. Ziel war herauszufinden, was das Endometriumgewebe von dem Lungengewebe in der Rückenhautkammer unterscheidet. Dabei untersuchten wir nicht nur die Angiogenese, sondern unterzogen das Endometrium ebenfalls den Hypoxie-Hyperoxie-Serien (3.3). Endometrium war in der Rückenhautkammer eines syrischen Goldhamsters bereits etabliert und charakterisiert (Laschke et al., 2005). Zudem gehört es zu den nicht überlebenswichtigen Organen und konnte so den Versuchstieren selbst entnommen werden, ohne Spendertiere zu benötigen. Unser Ziel war bei dieser Versuchsreihe, die Unterschiede zwischen diesen beiden Gewebearten herauszuarbeiten: Wie unterscheidet sich ihre Angiogenese? Gibt es Unterschiede in dem zeitlichen Verlauf des Anwachsens der ektopen Gewebestücke? Sind die hämodynamischen Parameter unterschiedlich? Wie reagiert Endometrium auf die Hypoxie und Hyperoxie, der wir auch das Lungengewebe ausgesetzt hatten?

3.3 Hypoxie-Hyperoxie-Serien

Die Frage, die wir uns vor dieser Versuchsreihe stellten, war: Verhalten sich die ektopen Lungenstücke innerhalb der Rückenhautkammer wie normales Lungengewebe? Denn um die Qualität beziehungsweise die Richtigkeit unserer ersten Versuchsreihe - der Charakterisierung von ektopen Lungengewebe in der Rückenhautkammer - festzustellen, war es von großer Wichtigkeit herauszufinden, ob das transplantierte Lungengewebe sich wie gewöhnliches Lungengewebe verhält. Denn nur unter der Bedingung würde die weiterführende Untersuchung an dem ektopen Lungengewebe in diesem Modell einen Sinn ergeben. Andersherum gefragt, wenn sich das transplantierte Lungengewebe nicht wie normales Lungengewebe verhält, welchen Sinn machen dann die Versuche an dem transplantierten Gewebe? Wodurch zeichnet sich Lungengewebe

aus, was unterscheidet es von anderem Gewebe? Ein hier in dieser transparenten Kammer leicht zu untersuchendes Unterscheidungsmerkmal ist das Verhalten der Gefäße. Lungengefäße sind dafür kennzeichnend unter Hypoxie - im Gegensatz zu allen anderen Gefäßen anderer Organe - mit einer Vasokonstriktion zu reagieren. Dieses Merkmal ist einmalig. Wenn unsere transplantierten Lungenstücke also diese Funktion beibehalten sollten, würde dies die Vermutung nahe legen, dass sie auch sonst ihre pulmonalen Eigenschaften beibehalten; wäre dies nicht der Fall, würden wir davon ausgehen, dass sie die Eigenschaften des Kammergewebes übernehmen. Beide Resultate sind denkbar, denn zwar handelt es sich um frisch explantiertes intaktes Lungengewebe, das wir in die Kammer implantieren, doch muss dieses einen neuen Anschluss an das Gefäßnetz bilden und ist insofern anders als herkömmliches Lungengewebe, da es nun nicht mehr an die Ventilation angeschlossen ist.

3.4 Ischämie-Reperfusionsschaden

Um später das Homing von endothelialen Progenitorzellen - unser Endziel dieser Studie - zu untersuchen, brauchten wir zunächst ein Schadensmodell. Wir entwickelten ein Modell innerhalb der Rückenhautkammer, in dem eines der implantierten Lungenstücke durch mechanischen Druck für eine gewisse Zeit ischämisch gemacht wurde (siehe 4.6). So improvisierten wir einen Schaden an einem der Lungenstücke. Die Fragestellung bei dieser Versuchsreihe war: Wie macht sich die Ischämie bemerkbar? Wie reagieren Lungen- und Kammergewebe auf den Durchblutungsstopp? Um dies zu untersuchen, führten wir den Schaden an gut revaskularisierten Lungengewebsstücken durch und mikroskopierten intravital für eine Zeitspanne von 24 Stunden.

3.5 Homing von endothelialen Progenitorzellen

Nachdem wir den ischämischen Schaden an einem der Lungenstücke charakterisiert und dann analysiert hatten, wie dieser sich auf das betroffene Lungengewebe auswirkt, applizierten wir gefärbte endotheliale Progenitorzellen (siehe 4.7.2) und beobachteten im Intravitalmikroskop, wohin diese Zellen wanderten. Hierbei war die Frage: Wohin werden die applizierten Zellen gehen, wandern die Stammzellen bevorzugt in das geschädigte Lungengewebe? Gehen die Zellen generell vermehrt in das Lungengewebe, also auch in die Kontrolllungen? Oder verteilen sich die endothelialen Progenitorzellen gleichmäßig oder bleiben sie gar im Kapillarbett hängen?

4 Material und Methodik

Ein Teil der Versuche entstand durch die Kontribution verschiedener Mitarbeiter wie Frau Dr.med. Susanne Heyer, Annika Ballsazs, PD Dr. med. Matthias Laschke, PD Dr.med. Jürg Hamacher sowie Dr.med. René Schramm.

4.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an C57BL/6-Mäusen aus eigener Inzucht (Institut für Klinische-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar) und an CD1nu/nu-Nacktmäusen von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt.

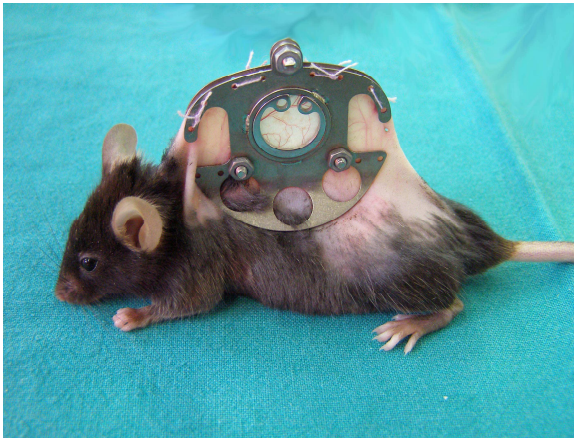


Abbildung 2: C57BL/6-Maus mit einer Rückenhautkammer

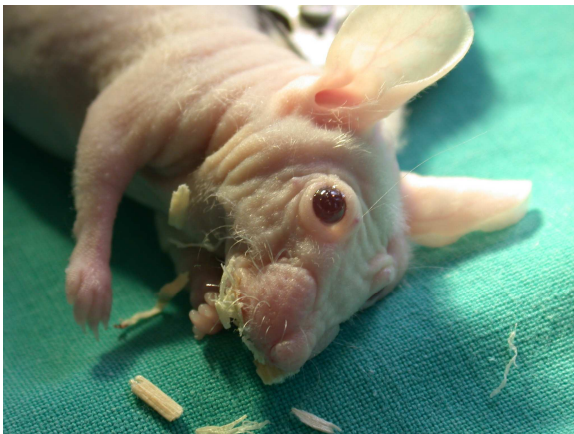


Abbildung 3: CD1 nu/nu-Nacktmaus

Sowohl zur Implantation der Rückenhautkammer als auch zur Entnahme von Lungengewebe und Endometrium wurden gesunde, geschlechtsreife Tiere im Alter von acht bis zehn Wochen mit einem Gewicht von 20-30 g benutzt. Während der Studien wurden sie in einem klimatisierten Raum bei 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus und unter Bereitstellung von Standardlaborfutter (Altromin, Lage) und Wasser ad libitum in Ein-

zelkäftigen gehalten. Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz durch das Landratsamt der Stadt Homburg/Saar genehmigt.

4.2 Modell Rückenhautkammer

4.2.1 Erläuterung des Modells

Als Grundlage unserer tierexperimentellen Versuche verwendeten wir die Rückenhautkammer, die quergestreifte Skelettmuskulatur, subkutanen Gewebe und Haut enthält, an C57BL/6-Mäusen zur Analyse der physiologischen Angiogenese von transplantiertem ektopen Lungen- und Endometriumgewebe. Die Rückenhautkammer wurde erstmalig an einer Maus von Lehr et al. 1993 gebraucht. Sie ermöglicht die intravital-mikroskopische Untersuchung von mikrozirkulatorischen Parametern am narkotisierten Versuchstier. Mithilfe einer i.v.-Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen kann durch die Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskopie die Mikrozirkulation der frei präparierten Rückenhautmuskulatur und die Entstehung neuer Blutgefäße in den implantierten Transplantaten untersucht werden. Der Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Mikrozirkulationsmodellen besteht darin, dass die Entstehung neuer Blutgefäße über einen Zeitraum von 2 Wochen dargestellt werden kann und wiederholte Messungen möglich sind. Durch das Hinzuziehen von einem Bildverarbeitungssystem kann die Ausbildung der neuen Gefäße nachher quantifiziert werden.

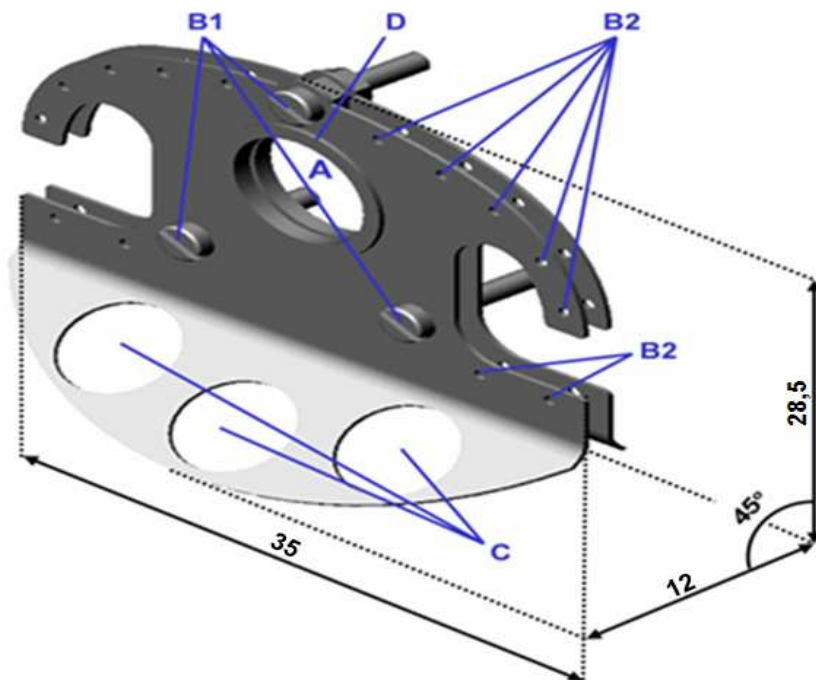


Abbildung 4: Perspektivische Ansicht einer Rückenhautkammer, die sich aus zwei durch Schrauben verbundene, spiegelbildlich konstruierte Titan-Rahmen zusammensetzt (Gewicht 3,2g). A = Beobachtungsfenster; B1 = Bohrungen mit Verbindungsschrauben; B2 = Bohrungen für Fixationsfäden; C = Materialaussparungen zur Gewichtsreduktion; D = Kammerring zur Fixation des Deckglases (Maße in mm). (Mit herzlichem Dank für die Überlassung des Bildes, dessen Original für die Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters gefertigt wurde, an Herrn PD Dr. M. W. Laschke, Institut für Experimentelle Chirurgie, Homburg, und auch an seinen Vater als Mitverfasser des Bildes)

Mittlerweile hat sich das Rückenhautkammermodell in verschiedenen Studien zur Untersuchung der Gefäßneubildung mit unterschiedlichsten Transplantaten bewährt. Beispiele hierfür stellen sowohl Organgewebe, wie Milz (Foitzick, Funk, Roth, & Messmer, 1988), Myokard (Funk, Endrich, & Messmer, 1986), Knochenmark (Funk et al., 1986) und Langerhans'sche Inseln (Menger et al., 1989; Menger et al., 1990; Menger et al., 1991), als auch Tumorgewebe (Vajkoczy et al., 1998; Vajkoczy et al., 2000) und synthetische bzw. biologische Implantationsmaterialien (Menger, Hammersen, & Messmer, 1992; Kraft, Hansis, Arens, Menger, & Vollmar, 2000; Menger, Hammersen, Walter, & Messmer, 1990) dar. Außerdem können mit der Rückenhautkammer weitere Aspekte der Mikrozirkulation untersucht werden. Diese schließen z.B. Untersuchungen über die physiologischen Steuerungsmechanismen des Gefäßbetts (Gerstberger, Meyer, Rettig, Printz, & Intaglietta, 1988), den Einfluss von Narkotika auf die Mikrozirkulation (Franke, Endrich, Laubenthal, Peter, & Messmer, 1982; Franke & Endrich, 1983) und die Veränderungen der Gewebepерfusion unter pathologischen Bedingungen, wie Entzündung (Westermann, Vollmar, Thorlacius, & Menger, 1999), Ischämie (Sack, Funk, Hammer-

sen, & Messmer, 1987) und Gewebetrauma (Yamauchi, Vollmar, Wolf, & Menger, 1999) ein.

4.2.2 Implantation der Rückenhautkammer

Um die Rückenhautkammer zu implantieren, wurde die Maus zunächst durch intraperitoneale Injektion von Ketamin/Xylazin (0.1ml/g Körpergewicht (KG); Narcoren; Merial GmbH, Hallbergmoos) anästhesiert. Die Augen wurden zum Schutz vor dem Austrocknen mit Vaselinecreme bedeckt. Anschließend wurde zwischen den Zehen mit einer Pinzette die Narkosetiefe getestet bevor mit den nächsten Schritten weitergefahren wurde.



Abbildung 5: Intraperitoneale Injektion der Anästhetika



Abbildung 6: Kneifen mit einer Pinzette zwischen den Zehen der Hinterläufe, um die Narkosetiefe zu testen.

Um freien Zugriff auf die Rückenhaut zu bekommen, wurde das Fell der Rückenhaut elektrisch rasiert (Elektra II GH 204; Aesculap, Tuttlingen) und anschließend chemisch depiliert (Pilca med Creme; Asid Bonz, Böblingen).



Abbildung 7: Rasur des Felles

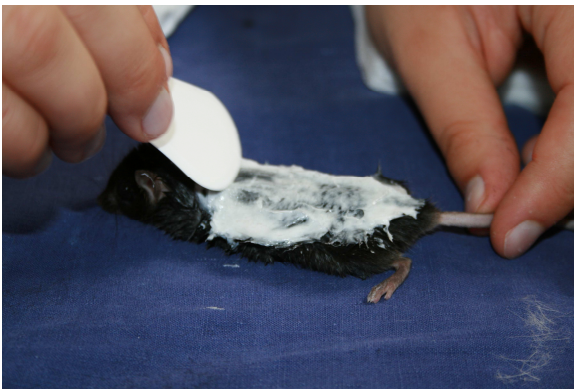


Abbildung 8: Depilation der Rückenhaut

Der nun enthaarte Bereich wurde mit warmem Leitungswasser gesäubert und darauf mit Waschäther und 70%-igem Alkohol desinfiziert. Das Versuchstier war nun vorbereitet für die Implantation der Rückenhautkammer. Dazu wurde die Maus in Bauchlage auf den mit OP-Tüchern abgedeckten Tisch gelegt, die dehbare Rückenhautfalte mit einer Hand angehoben und entlang ihrer Mittellinie mit zwei 5.0 Haltefäden aufrecht aufgespannt.



Abbildung 9: Aufspannen der Rückenhaut mit 2 Haltefäden

Unter dieser Bedingung konnte die rückseitige Hälfte der Titan-Kammer an ihrem oberen Rand mit 5.0 Seide-Nähten befestigt werden. Dabei wurde Gegenlicht verwendet, um die Gefäße der Hautfalte nicht zu beschädigen.



Abbildung 10: Befestigung des oberen Randes der Rückenhautkammer

Bei diesem Arbeitsschritt wurden auch zwei kleine Inzisionen an der Basis der Hautfalte durchgeführt, wodurch dann die Verbindungsschrauben hindurch kamen. Hierbei wurde weiterhin Gegenlicht verwendet, um nicht die beiden Hauptgefäßstämme innerhalb der Rückenhaut zu lädieren.

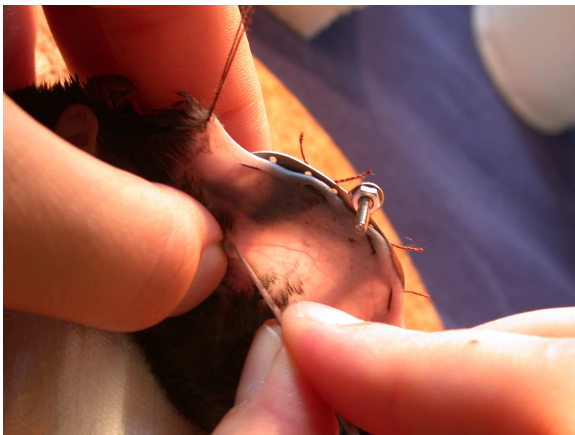


Abbildung 11: Inzision der Löcher für die Verbindungsschrauben

Danach wurden die beiden Haltefäden entfernt und der oben bereits festgenähte rückseitige Teil der Kammer weiter fixiert, indem auf die Verbindungsschrauben, die durch die Inzisionen gesteckt worden waren, jeweils eine Gefäßklemme gesetzt wurde. Das Versuchstier wurde dazu auf einer Korkplatte auf die Seite gelegt.



Abbildung 12: Die Verbindungsschrauben waren hier eingefügt und mit je einer Gefäßklemme fixiert. Mit Hilfe des Gegenlichtes wurde vorher mit einem Stift die Form des Rückenhautfensters markiert.

Das Tier wurde nun mitsamt der Korkplatte unter ein Stereo-Operationsmikroskop (Wild M650; Leitz, Schweiz) gelegt. In dem runden Bereich des späteren Kammerfensters der Rückenhautkammer wurden dann unter mikroskopischer Sicht die Cutis, Subcutis mit quergestreiftem Hautmuskel und die beiden Schichten des Retraktormuskels mit subcutanem Fettgewebe der nach oben gerichteten Seite der Rückenhaut abpräpariert. (siehe Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15). Es wurde dabei so verfahren, dass der Radius des präparierten Kreises ca. 4mm größer war als der des Plexiglasses, das später die Fläche abdeckte. Mit dieser Maßnahme sollte nach Anbringen der vorderen Rückenhautkammerhälfte eine Gewebekompression verhindert werden, da dadurch womöglich die Blutgefäße komprimiert worden wären. Das präparierte Feld wurde mehrmals mit steriler Elektrolytlösung gespült. Es bestand nun noch aus dem quergestreiften Hautmuskel, der Subcutis und einer Schicht Haut von der gegenüberliegenden Seite der Rückenhaut. Der vordere Teil der Rückenhautkammer wurde nun auf die Verbindungsschrauben gesteckt, und mit zwei Muttern auf den Schrauben wurde die Kammerhälfte mit der ersten fixiert. Zwischen den beiden Titan-Hälften verblieb ein Abstand von ungefähr 400-500µm. Nun wurde das Plexiglas auf den freiliegenden Hautmuskel vorsichtig mit einer Pinzette abgelegt, ohne dabei Lufteinschlüsse unterhalb des Glases zuzulassen. Bei Auftreten von Lufteinschlüssen wurde das Deckglas mit einer Pinzette und gebogenen Kanüle an einer Stelle langsam angehoben, so dass die Luft entweichen konnte, und dann vorsichtig wieder herunter gelassen. Das Deckglas wurde anschließend mit einem Sprengring mit Hilfe einer Klemmzange in der vorderen Seite des Titanrahmens befestigt (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24).



Abbildung 13: Abpräparation der Rückenhaut



Abbildung 14: Abpräparation der Rückenhaut

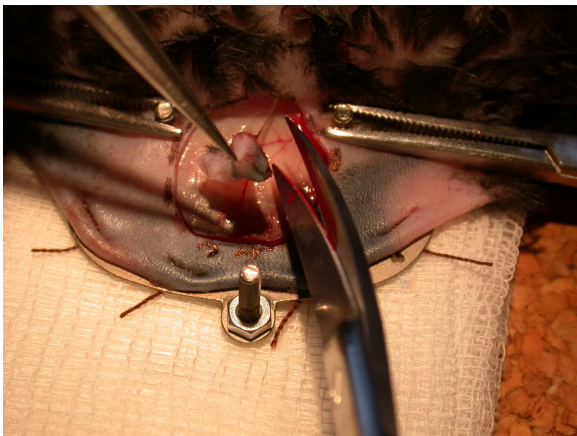


Abbildung 15: Abpräparation der Rückenhaut



Abbildung 16: Mikroskopisch wurden nun noch Reste der Subcutis entfernt.



Abbildung 17: Die Rückenhaut ist hier komplett entfernt.



Abbildung 18: Auflegen der 2. Hälfte der Titankammer



Abbildung 19: Spülung mit Kochsalzlösung



Abbildung 20: Abtupfen der überschüssigen Lösung



Abbildung 21: Befestigung der Kammerhälfte mithilfe von Muttern auf den Verbindungsschrauben.

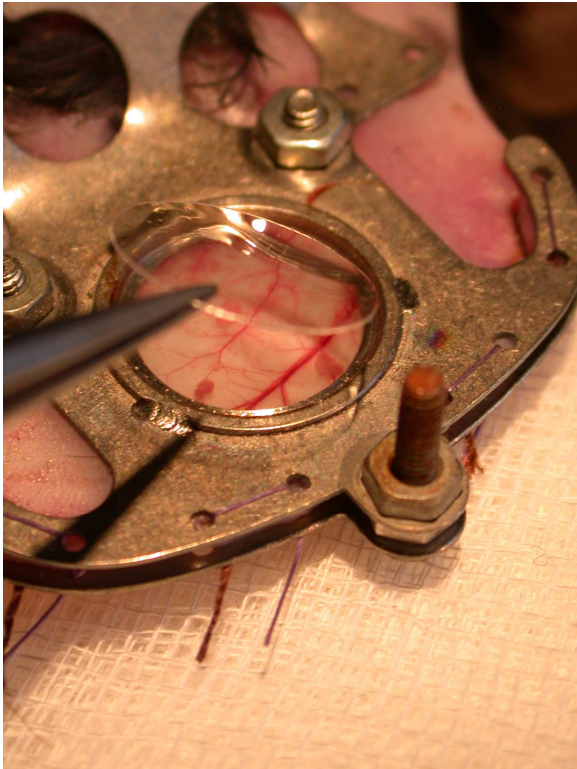


Abbildung 22: Auflegen des Deckglases



Abbildung 23: Nach Auflegen des Deckglases wurde der Klemmring angebracht.



Abbildung 24: Der Klemmring ist hier in Position.



Abbildung 25: Fixierung der beiden Kammerhälften mit Nähten

Ab diesem Zeitpunkt konnte über die gesamte Versuchszeit jederzeit dieses Deckglas kurzzeitig entfernt werden, um an die präparierte Fläche zu kommen. Als letzter Präparationsschritt wurde die vordere Rahmenhälfte nun auch mit 5.0 Seide-Nähten an der Rückenhaut festgenäht (siehe Abbildung 25 und Abbildung 4 mit den Bohrungen für Fixationsfäden (B2)). Nach dieser Prozedur wurde den Mäusen eine Pause für 48-72 Stunden gewährt, damit sie sich von der Narkose und der chirurgischen Präparation erholen konnten. Erst danach wurde Gewebe in die Rückenhautkammer implantiert (siehe 4.4.1).

4.3 Intravitale Mikroskopie

Die Revaskularisierung ektopen Lungengewebes und Endometriums wurde mittels der intravitale Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Für die Darstellung von dynamischen Vorgängen ist die *in-vivo*-Mikroskopie eine ausgezeichnete Messtechnik. So kann z.B. die Angiogenese an verschiedenen Beobachtungstagen direkt dargestellt werden. Die Mikrozirkulation innerhalb der Transplantate und der Rückenhautkammer wird aufgenommen, und anschließend können offline am Cap Image verschiedene mikrohämodynamische Parameter gemessen werden. Zur mikrovaskulären Analyse von ektopem

Lungengewebe in der Rückenhautkammer ist diese Technik geeigneter als die indirekten Meßmethoden wie zum Beispiel die Laser-Doppler-Flowmetrie [Tooke et al., 1983; Ahn et al., 1986].

Den Versuchsmäusen wurden vor den intravitalmikroskopischen Untersuchungen Farbstoffe intravenös appliziert: FITC-Dextran (5%; 0,1ml; MG 150000; Sigma) zur Anfärbung des Blutplasmas (siehe Abbildung 26) und folgenden Kontrastverstärkung und Rhodamin-6G (0,1%; 0,1ml; MG 479; Sigma) zur *in vivo* Kontrastierung der Leukozyten (siehe Abbildung 27). Die beiden Farbstoffe wurden im Vorfeld im Verhältnis 1:1 gemischt und unter bestehender Narkose den Mäuse retrobulbär injiziert.

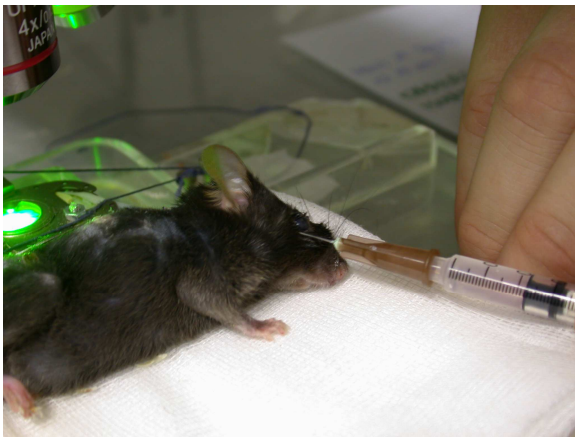


Abbildung 26: Injektion der Farbstoffe retrobulbär

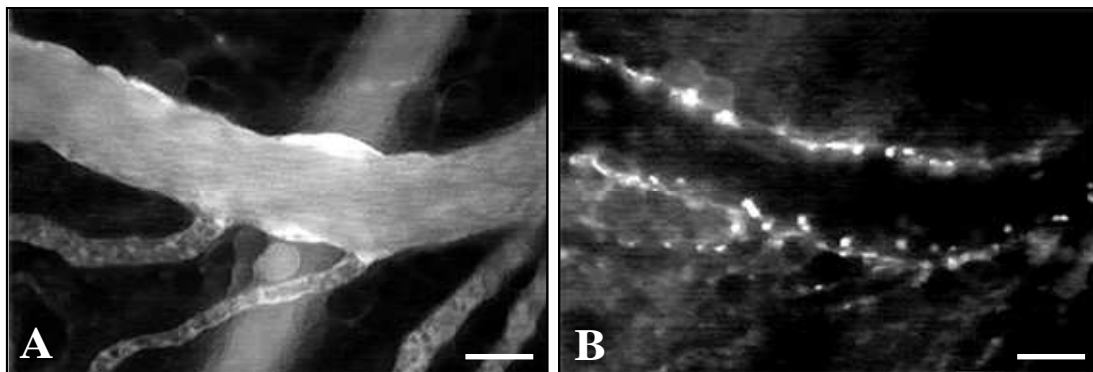


Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Sammelvenole und ihrer Zuflüsse in der Rückenhautkammer. Mittels des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran wurden durch die Anfärbung von Blutplasma die Blutgefäße in Blaulicht-Epi-Illumination dargestellt (A), während Rhodamin-6G in Grünlicht-Epi-Illumination (B) selektiv die Leukozyten als helle Punkte markierte (Intravitale Fluoreszenzmikroskopie; A, B: — = 60µm).

Die Mäuse wurden für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abbildung 28) auf einer Plexiglasbühne immobilisiert und die Rückenhautkammer so fixiert, dass sie sich auf dem Mikroskoptisch in horizontaler Lage befand.

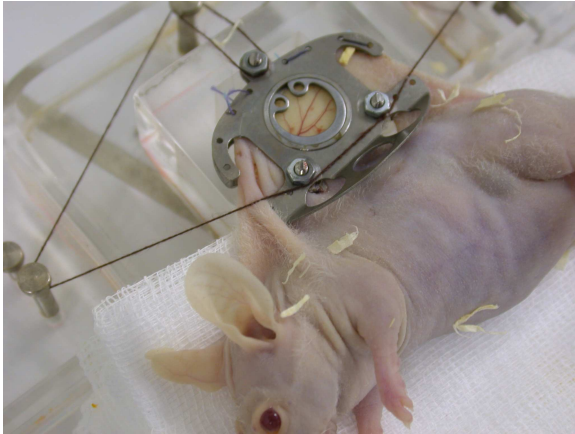


Abbildung 28: Maus mit Rückenhautkammer auf einer Plexiglasbühne: So befand sich die Kammer in horizontaler Lage und konnte für die Mikroskopie gut millimetergenau bewegt werden.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem modifizierten Leitz-Orthoplan-Mikroskop (Leitz GmbH, Wetzlar) mit Auflicht- und Durchlicht-Einrichtung. Für die Auflicht-Technik wurde eine 100W Quecksilber (HBO) Lichtquelle (Leitz) an ein Ploemopak-Illuminator System adaptiert. Mit drei Filterblöcken, die zwischengeschaltet waren, konnte Licht der Wellenlänge 330-390nm, 450-490nm bzw. 530-560nm angeregt werden und eine Filterung des emittierten Lichts unterhalb 430nm, 515nm bzw. 585nm durchgeführt werden.



Abbildung 29: Maus auf der Plexiglasbühne unter dem Intravitalmikroskop mit fluoreszierendem Licht

Die durch das Intravitalmikroskop dargestellten Bilder konnten mithilfe eines FSA-Tubus-GW sowie eines Vario-Zooms (Leitz) und einer CCD (charge coupled device)-Videokamera (CF 8/1 FMC; Kappa Messtechnik GmbH, Gleichen-Rheinhausen) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde aufgenommen werden. Des Weiteren war ein Videotimer (VTG 33; FOR-A Company Ltd., Japan) zwischengeschaltet, mit dem es möglich war, die Versuchstiernummer und den Untersuchungszeitpunkt

nach Transplantation festzuhalten. Die dargestellten Bilder wurden auf ein $\frac{3}{4}$ Zoll Videobandgerät (Panasonic AG 7350; Matsushita Electric Ind. Co., Ltd., Japan) weitergeleitet und auf einem Videomonitor (PVM 1444; Sony, Tokio, Japan) wiedergegeben. Für Übersichtsbilder wurde ein 4x Objektiv (Numerische Apertur (n.a.): 0.16; Olympus, Graz, Österreich) bzw. ein 6,3x Objektiv (n.a: 0.16; Zeiss, Jena) mit langem Arbeitsabstand verwendet. Für Detailaufnahmen der neu gebildeten Gefäßnetzwerke innerhalb der Transplantate und für die Messung hämodynamischer Parameter diente ein 10x (n.a. 0.30; Zeiss) bzw. ein 20x Objektiv (n.a: 0.32; Zeiss) mit langem Arbeitsabstand. Mittels dieser optischen Systeme konnten Vergrößerungen von x86, x136, x216 bzw. x432 unter Verwendung des Vario-Zooms auf dem Monitor erzielt werden.

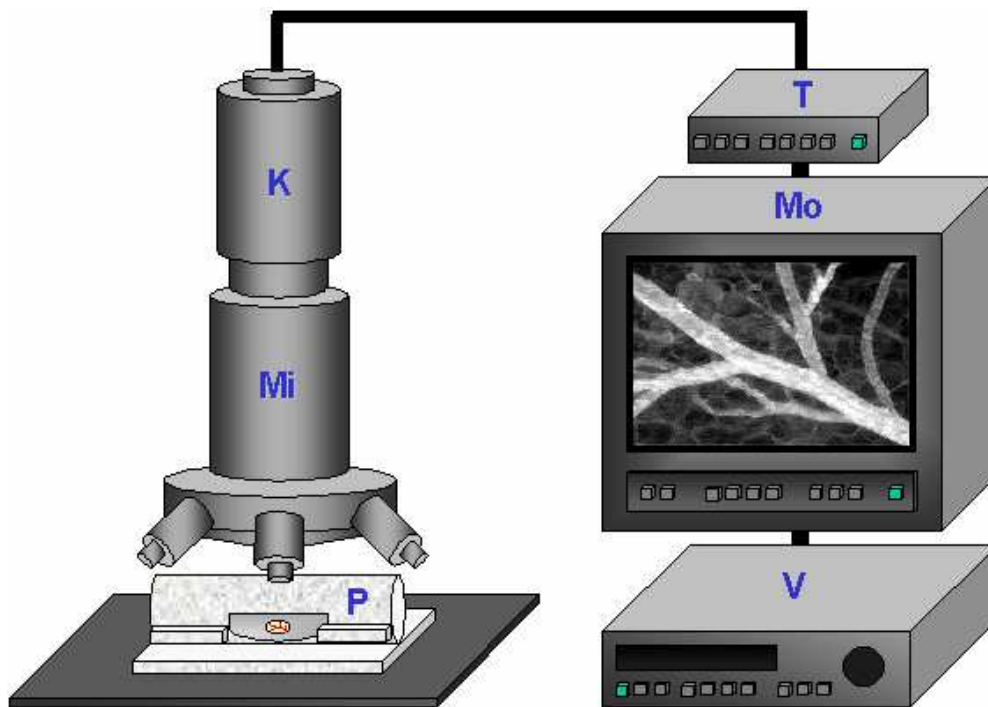


Abbildung 30: Schematische Darstellung des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes mit Mikroskop (Mi), Videokamera (K), Videotimer (T), Monitor (Mo) und Videogerät (V). Zur Mikroskopie wurde die Maus auf einer Plexiglasbühne (P) immobilisiert und die Rückenhautkammer in horizontaler Lage fixiert. (mit herzlichem Dank für die Überlassung des Bildes, an Herrn PD Dr. M. W. Laschke, Institut für Experimentelle Chirurgie, Homburg, und auch an seinen Vater als Mitverfasser des Bildes)

4.3.1 Mikrozirkulatorische Parameter

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Rückenhautkammer erlaubte es, die physiologische Angiogenese in den ektopen Gewebestücken objektiv zu quantifizieren, indem folgende Parameter gemessen wurden: Mit dem 4x bzw. 6,3x Objektiv konnte die Organfläche der implantierten Lungen- und Endometriumstücke und der Anteil der Fläche, der an dem Messtag revaskularisiert war, erfasst werden. Mithilfe des 20x Ob-

jektives konnten die hämodynamischen Parameter innerhalb der ausgesuchten Gefäße wie Durchmesser, Blutzellgeschwindigkeit, Fließverhalten der Leukozyten, Anzahl apoptotischer Zellen in den Transplantaten und auch die funktionelle Kapillardichte gemessen werden.

Die Auswertungen der mikrozirkulatorischen Parameter erfolgten nach Beendigung der Versuche offline durch Wiederabspielen der aufgenommenen Bilder auf Videoband mithilfe des computerassistierten Bildverarbeitungssystems CapImage (Version 6.02; Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg). Auf diese Weise konnte die Untersuchungszeit für die Maus so kurz wie möglich gehalten und die Belastung für das Tier minimiert werden.

4.3.1.1 Fläche

Um während der gesamten Versuchszeit die Transplantatgewebe gut vom Kammergewebe abgrenzen zu können, wurden die explantierten Gewebe vor der Implantation in die Rückenhautkammer im DMEM-Medium mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H33342 angefärbt (siehe Abbildung 31).

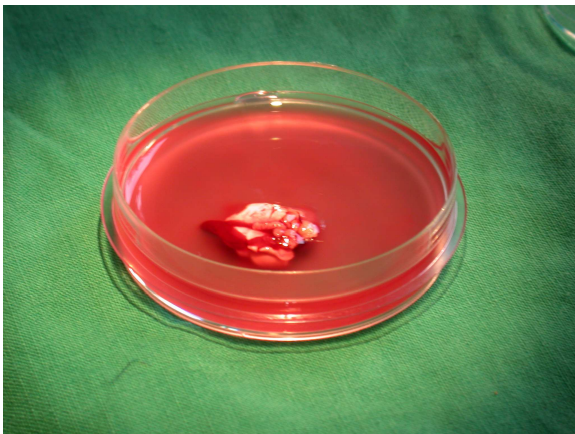


Abbildung 31: Explantierte Lunge in einer Petrischale mit Bisbenzimid

Dieses Fluorochrom, das durch ein Absorptionsmaximum bei Licht der Wellenlänge 340nm und ein Emmissionsmaximum bei Licht der Wellenlänge 450nm charakterisiert ist, markiert Zellkerne durch Anlagerung an AT-reiche Sequenzen der DNS. Die Fluoreszenz bleibt dabei bei lebenden, unfixierten Zellen über mehrere Zellgenerationen erhalten. Dieser Hoechst-Farbstoff wird deshalb oft für Kombinationen zur klassischen und etwas schwarz-weißen Einordnung von Zellkernen in die Kategorien „lebendig“, „apoptotisch“ und „nekrotisch“ z. B. als Sytox-Hoechst-Färbung benutzt, um zusammen mit der Morphologie des Zellkerns diesen klassifizieren zu können.

Um die Fläche der transplantierten Gewebestücke - sowohl Lungengewebe als auch Endometriumgewebe - zu messen, wurden die Stücke am Bildschirm durch Umrandung markiert und alle sich innerhalb dieser Fläche befindlichen Bildpunkte erfasst. Der

Flächeninhalt wurde dann in mm² angegeben. An den verschiedenen Messtagen wurde nicht nur die Gesamtfläche des Organs gemessen, sondern auch die revaskularisierte Fläche, also der Anteil der Gesamtorganfläche in Prozent, der zu dem jeweiligen Zeitpunkt bereits revaskularisiert war.

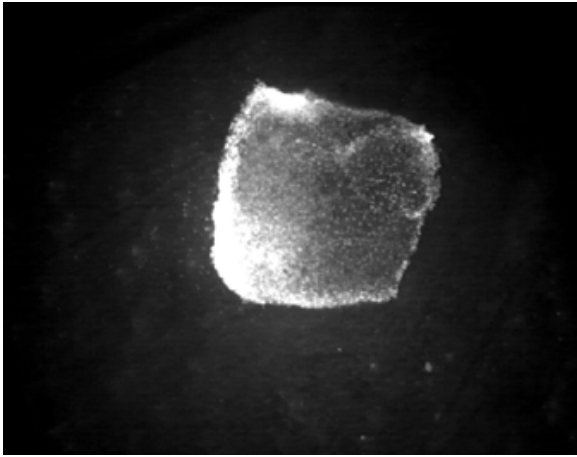


Abbildung 32: Ein implantiertes Lungenstück direkt nach Implantation

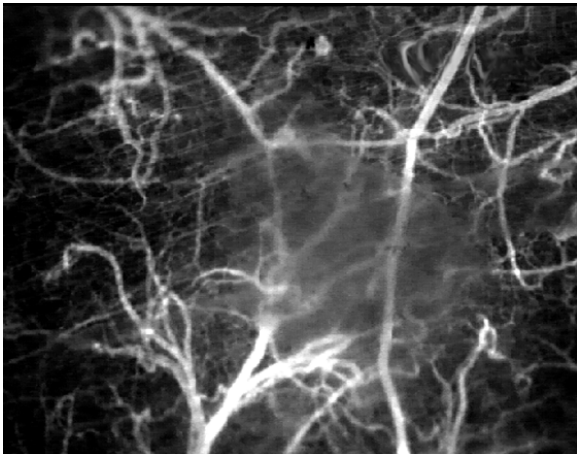


Abbildung 33: Ein implantiertes Endometriumstück direkt nach Implantation

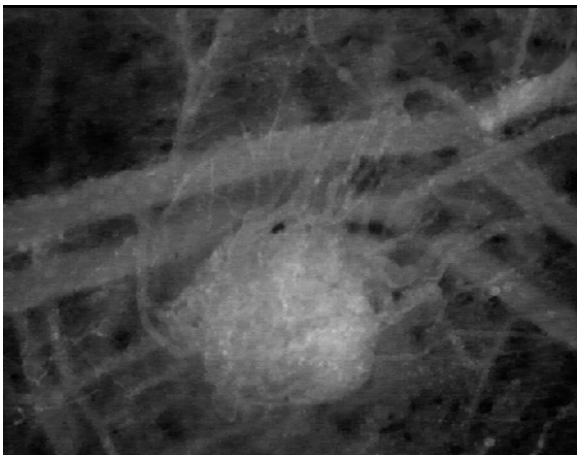


Abbildung 34: Ein implantiertes Lungenstück an Tag 10 nach Implantation

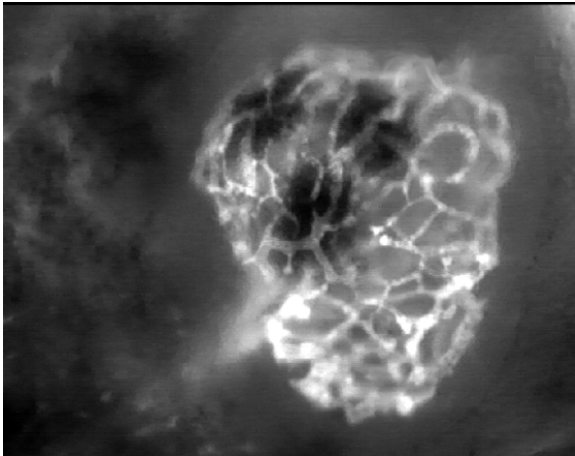


Abbildung 35: Endometriumstück 10 Tage nach Implantation

Abbildung 32 bis Abbildung 35 : Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Bisbenzimid H33342-gefärbten Lungen- und Endometriumstückes in der Rückenhautkammer an den Tagen 0 und 10 nach Transplantation. In der Übersichtsaufnahme grenzt sich das ektope Organ durch die Färbung in Ultraviolett-Epi-Illumination deutlich von seiner Umgebung ab.

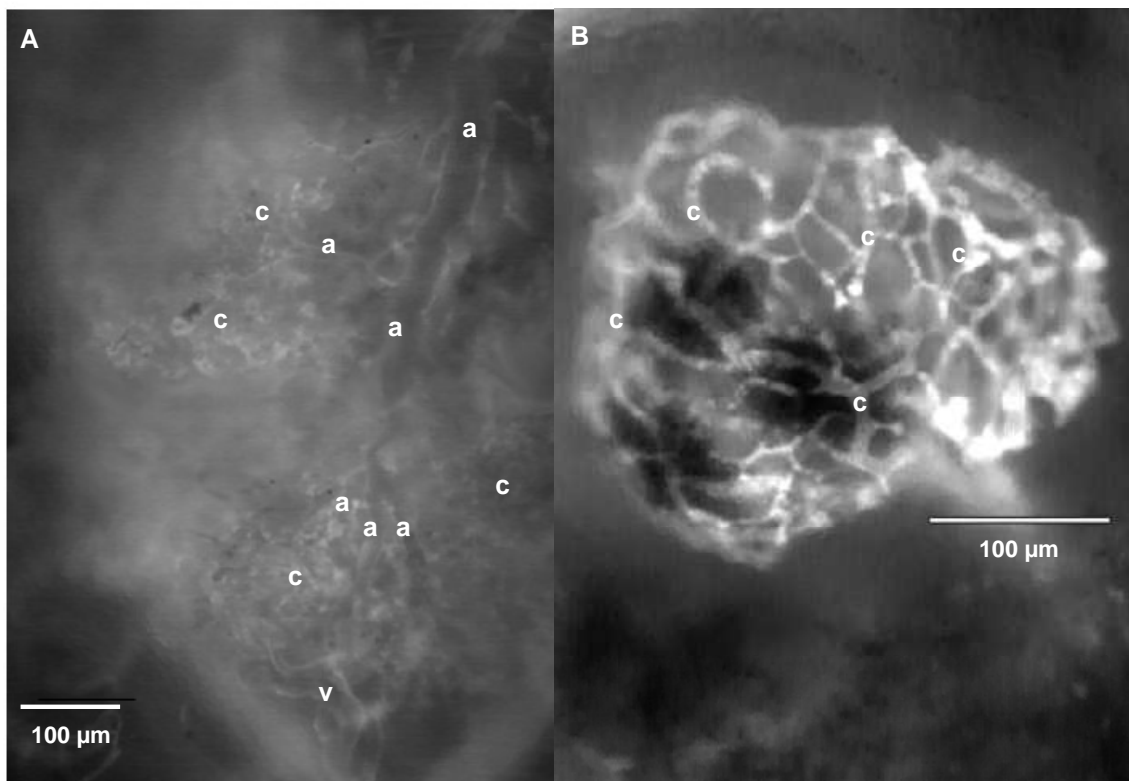


Abbildung 36: Intravitalmikroskopische Darstellung (x20) von Lungengewebe (Bild A) und Endometriumgewebe (Bild B) 14 Tage nach Implantation in die Rückenhautkammer einer C57BL/6-Maus. Bei einem guten Blutfluss sind die Gefäße in Arteriolen (a), Venolen (v) und Kapillaren (c) trennbar. Bild B zeigt die glomerulartige Struktur der Gefäße im Endometrium.

4.3.1.2

Durchmesser

Um die einzelnen Durchmesser der ausgewählten Gefäße zu bestimmen, wurden zwei Randpunkte des jeweils zu messenden Gefäßes durch eine senkrecht zum Gefäß laufende Linie am Videobild verbunden und deren Länge in μm ausgedrückt. Das Videoband wurde für diese Messungen an einer idealen Stelle angehalten, und so konnte

am stehenden Bild der jeweilige Durchmesser exakt ausgemessen werden. Die Gefäßbegrenzungen konnten hierbei nicht immer exakt ausgemacht werden. Dies hatte folgende Ursache: Durch die Applikation des Plasma-Markers FITC-Dextran für die Fluoreszenzmikroskopie wurden nicht nur die Erythrozyten selber, sondern auch der Erythrozyten-freie Plasmasaum dargestellt. An den jeweiligen Untersuchungstagen wurden die Durchmesser von jeweils 10 Gefäßen pro Transplantat gemessen und daraus das arithmetische Mittel gebildet. Die ausgewählten Gefäße wurden dabei standardisiert ausgesucht: Durch das Transplantat wurde eine horizontale und eine vertikale Achse durch den Mittelpunkt gedacht und nur Gefäße ausgesucht, die diese Achsen schnitten.

4.3.1.3 Flussgeschwindigkeit

An denselben Gefäßen, an denen die Gefäßdurchmesser (siehe 4.3.1.2) bestimmt wurden, wurde auch die Blutzellgeschwindigkeit ermittelt. Wie zuvor bei den Gefäßdurchmessern wurden auch hier dieselben 10 Gefäße pro Transplantat und pro Mess-tag gemessen und aus allen Einzelwerten das arithmetische Mittel bestimmt. Um die Blutzellgeschwindigkeit zu bestimmen, wurde mit der computeraissistierte Line-Shift-Diagramm-Methode gearbeitet. [Klyscz et al., 1997]. Dabei zeichneten wir auf dem Bearbeitungsbildschirm entlang der Flussrichtung des zu messenden Gefäßes eine mittig im Gefäßlumen liegende Linie und ließen nachfolgend das Videoband für ca. 10 Sekunden in Echtzeit abspielen. Die Maschine erzeugte in der Zeit kontinuierlich für jedes Halbbild entlang der Messlinie das Grauwertprofil und speicherte dies in einem Bildspeicher. Mittels der aneinander gereihten Grauwertprofile fertigte der Computer ein Line-Shift-Diagramm an, das aus hellen und dunklen schrägen Linien bestand, die dadurch entstanden, dass sich während der Messung Plasmalücken bzw. Erythrozyten entlang der Messlinie bewegten. Dann konnte durch die Steigung der erzeugten Linien die Blutzellgeschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{sec}$ ermittelt werden.

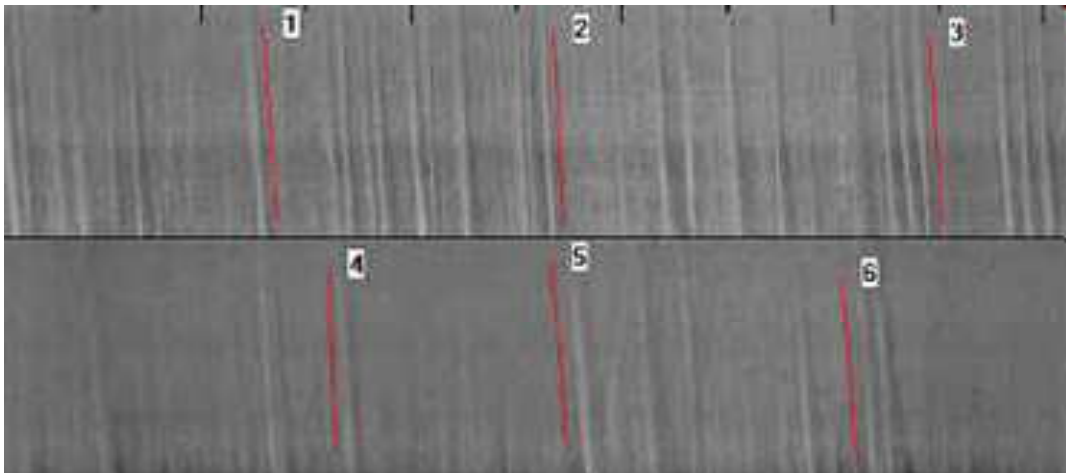


Abbildung 37: Line-Shift-Diagramm-Methode zur Ermittlung der Blutzellgeschwindigkeit (aus Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg)

4.3.1.4 Funktionelle Kapillardichte

Um die funktionelle Kapillardichte der einzelnen Transplantate zu errechnen, wurde die Gesamtlänge aller mit Erythrozyten perfundierten Gefäße innerhalb eines gemessenen Areals nachgezeichnet und gemessen und im Verhältnis zur gemessenen Arealfläche in cm^2 gesetzt. Die Einheit der funktionellen Kapillardichte war demnach cm/cm^2 . Kapillaren, in denen keine Perfusion ausgemacht werden konnte, die lediglich Blutplasma enthielten, wurden hierbei nicht berücksichtigt.

Gemessen wurden pro Transplantat jeweils drei repräsentative, gut vaskularisierte Areale, um dann daraus den arithmetischen Mittelwert berechnen zu können. So konnte für jeden Messtag die funktionelle Kapillardichte der einzelnen Transplantate bestimmt werden. Diese Areale wurden standardisiert so ausgewählt, dass sie stets auf einer gedachten Horizontalen durch den Mittelpunkt des Transplantates lagen.

4.3.1.5 Fließverhalten der Leukozyten

Durch die vorherige Applikation vom Fluoreszenz-Marker Rhodamin-6G konnten die Leukozyten *in vivo* angefärbt und so im Intravitalmikroskop sichtbar gemacht werden. In denselben Arealen, wo vorher die funktionelle Kapillardichte (siehe 4.3.1.4) bestimmt worden war, konnte nun die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beurteilt werden. Es wurde hierbei zwischen i) frei fließenden Leukozyten, ii) rollenden Leukozyten, die

durch eine Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit aufgrund Margination und kurzzeitigen Endothelkontaktes gekennzeichnet waren, und iii) adhären Leukozyten, die dem Gefäßendothel während einer Beobachtungszeit von mindestens 20 Sekunden fest anhaften, unterschieden. Die Anzahl der Leukozyten wurde dabei stets pro funktionelle Kapillardichte gemessen, um Verzerrungen bei unterschiedlich stark durchbluteten Arealen auszuschließen.

4.3.1.6 Apoptose

Zur Beurteilung der Vitalität der ektopen Transplantate wurden an den jeweiligen Messagen die Apoptose qualitativ beurteilt. Bei den apoptotischen Zellen kommt es schon zu Beginn des programmierten Zelltodes zu einer gesteigerten Kondensation und Fragmentation des nuklearen Chromatins. Daraus ergibt sich, dass Teile ihrer Zellkerne in der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie durch den DNS-Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H33342 als intensiv leuchtende, punktförmige Bereiche nachweisbar sind [Westermann et al., 1999]. Die Präparate konnten wir nur rein qualitativ auf das grobe Ausmaß der Apoptose überprüfen, eine quantitative Messung konnte aufgrund der Transplantatdicke und der damit fehlenden Abgrenzbarkeit apoptotischer Zellen nicht durchgeführt werden.

Die Apoptoserate im Lungen-/Endometrium- und Kammergewebe wurde ebenfalls immunhistochemisch mittels Caspase-3-Färbung der histologischen Präparate und Auszählung positiver Zählen pro high power field im 40er Objektiv ermittelt.

4.3.2 Differenzierung Arteriolen und Venolen

Zu Beginn unserer experimentellen Studie gingen wir davon aus, dass wir in der Lage sein würden, die Gefäße der implantierten Lungenstücke in Arteriolen, Venolen und Kapillaren zu differenzieren. Wir waren der Meinung, dass das Blut in den Arteriolen von den großen in immer kleiner werdende Gefäße fließe und dass in den Venolen das Blut umgekehrt von den kleinen, zu immer größer werdenden und schließlich in die großen Sammelvenolen fließe. Wir mussten jedoch feststellen, dass diese genaue Zuweisung der beobachteten Gefäße nicht immer eindeutig vorzunehmen war. So floss in bestimmten Bildabschnitten das Blut von den großen in kleiner werdende Gefäße und änderte unerwartet vor unseren Augen die Fließrichtung. Während wir bis dahin noch an jedem Transplantat jeweils 10 Arteriolen, Venolen und Kapillaren auf ihre hämodynamischen Parameter hin untersuchten, einigten wir uns dann darauf, lediglich 10 Gefäße in einer bestimmten Größe pro Transplantat zu messen. Es war nicht ganz eindeutig zu erklären, was hämodynamisch in dem ektopen Lungengewebe vor sich ging.

Wie kam es zu diesen Flussumkehrungen? Weshalb existierten Gefäße, die weder eindeutig Arteriolen noch Venolen sind? Welche Prozesse liefen hier ab?

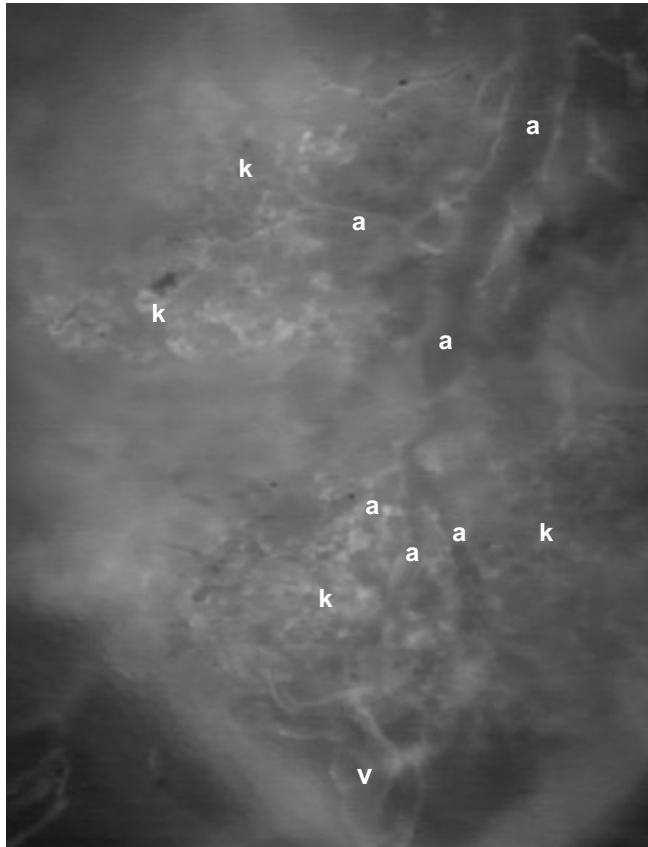


Abbildung 38: Ektopes Lungengewebe in der Rückenhautkammer an Tag 14 nach Implantation: a= Arteriole, k= Kapillare, v= Venole

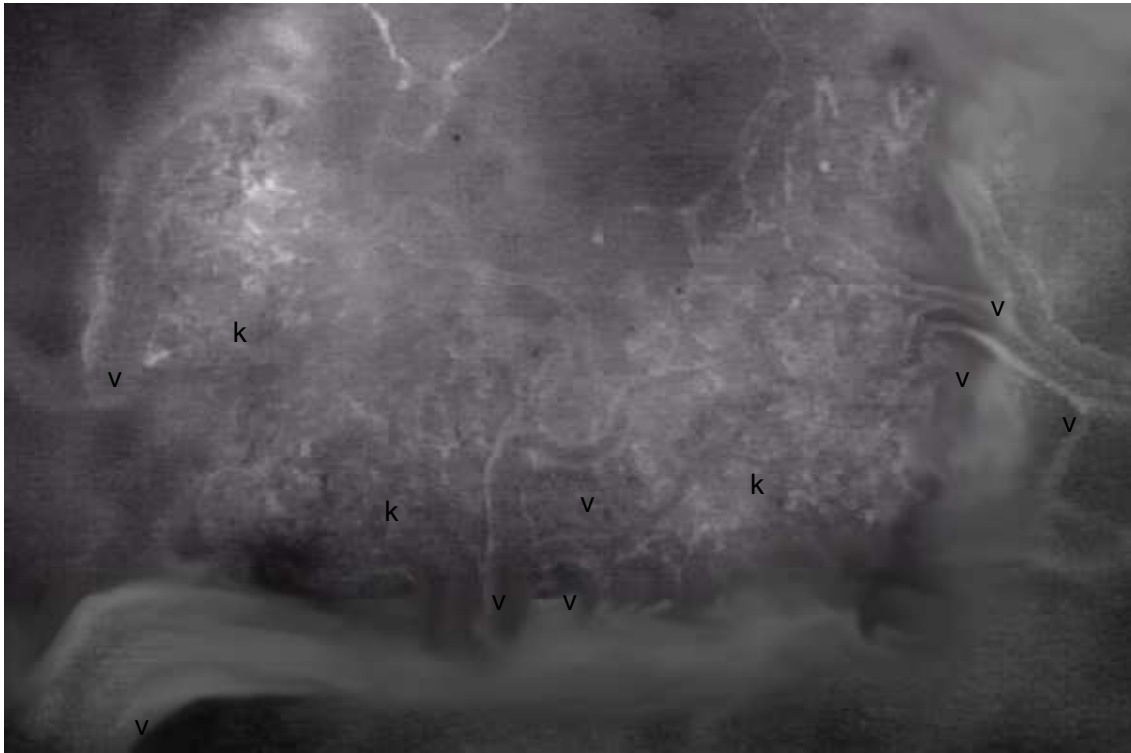


Abbildung 39: Ektopes Lungengewebe 14 Tage nach Implantation in die Rückenhautkammer: V= Venolen, K= Kapillaren

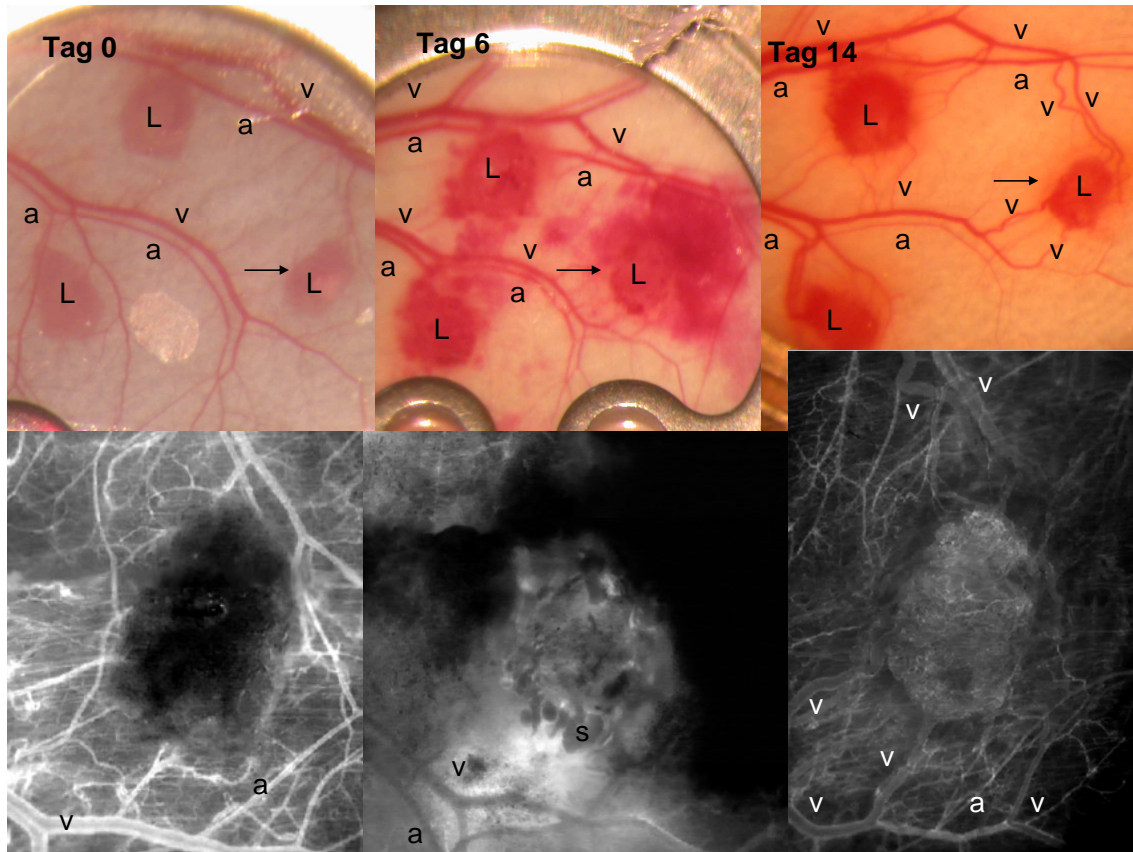


Abbildung 40: Lungengewebe in der Rückenhautkammer an den Tagen 0, 6 und 14 makroskopisch und darunter jeweils intravitalmikroskopisch: a= Arteriolen, v= Venolen, L= Lungengewebe

4.4 Präparation von Lungengewebe

Drei Tage nach Implantation der Rückenhautkammer wurde Lungengewebe präpariert, um dieses in die Kammer zu implantieren. Zur Gewinnung von Lungengewebe wurde eine isogene Spendermaus narkotisiert (Ketamin/Xylazin) und an der Bauchseite elektrisch rasiert (Elektra II GH 204; Aesculap, Tuttlingen). Beim Enthaarungsvorgang musste darauf geachtet werden, dass nicht mit der Rasierklinge von unten kommend am eventuell hervorstehenden Xiphoid hängen geblieben wurde.

Das Versuchstier wurde nun, auf dem Rücken liegend, auf eine Korkplatte gelegt und die Pfoten mit Klebestreifen fixiert, um die Haut an Brust und Bauch zu spannen. Mit Hilfe einer Pinzette wurde die Haut gehalten und mit einer Schere eine mediane Thorakotomie durchgeführt. Nun wurde das Zwerchfell eröffnet und die beiden Lungenhälften mitsamt der Trachea gehalten und am proximalen Ende der Trachea abgetrennt. Das entnommene Gewebe wurde in eine Petrischale (Durchmesser 100mm; Greiner, Frickenheim) transferiert, die 37°C warmes DMEM-Medium (10% FCS; 0.1mg/ml Gentamycin) und den DNS-Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H33342 (200µg/ML; Molekulargewicht (MG) 562; Sigma, Deisenhofen) zur Anfärbung des Lungengewebes enthielt. Unter Sicht durch das Stereo-Operationsmikroskop (Wild M650; Leitz, Schweiz) wur-

den in der Petrischale subpleurale Parenchymstücke herausgeschnitten und diese in eine zweite Petrischale mit 37°C warmem, Bisbenzimid-freiem DMEM-Medium transferiert. Unter diese zweite Schale wurde eine Schablone mit schwarzen Vierecken á 0.5mm Kantenlänge gelegt, um mit dessen Hilfe mehrere Lungenparenchymwürfel mit einer Kantenlänge von 0.5mm zu präparieren. Die Lungenstücke sollten pleurafrei sein, da die Pleura die Angiogenese behindern könnte. Da sich aus einer Spenderlunge viele Lungenwürfel in der angegebenen Größe präparieren ließen, konnten diese für 3-5 Empfänger-mäuse verwendet werden.



Abbildung 41: Das narkotisierte Versuchstier wurde an den Pfoten mit Klebeband fixiert, um die Haut an Brust und Bauch zu spannen.



Abbildung 42: Es erfolgte eine mediane Thorakotomie.



Abbildung 43: Das Zwerchfell wurde eröffnet.



Abbildung 44: Die Rippen wurden zur Seite gebogen.

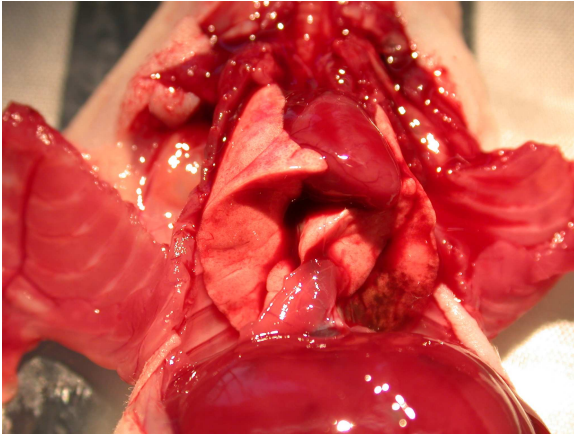


Abbildung 45: Der eröffnete Thoraxraum

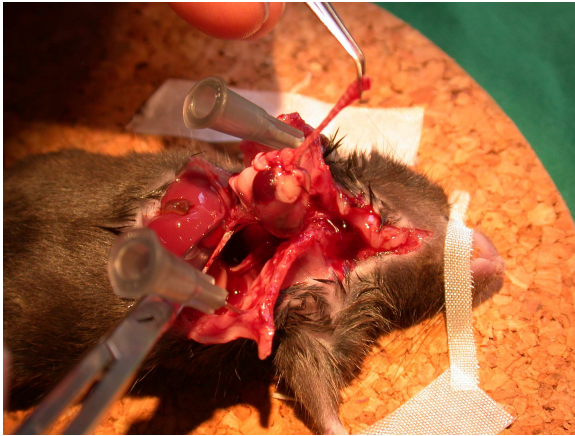


Abbildung 46: Die beiden Lungenhälften wurden als Ganzes mitsamt der Trachea explantiert.

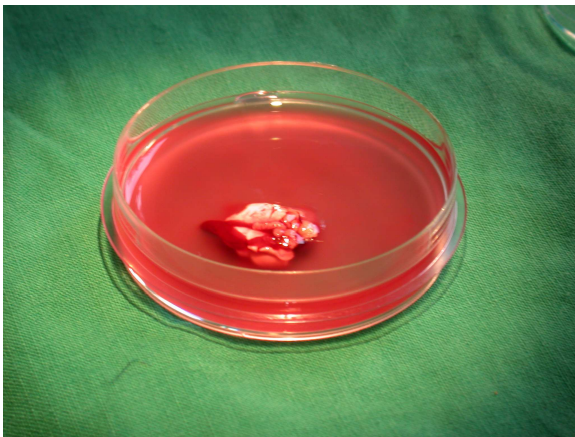


Abbildung 47: Die entnommenen Lungen wurden zunächst in eine Petrischale mit DMEM-Medium und Bisbenzimidazolium transferiert.

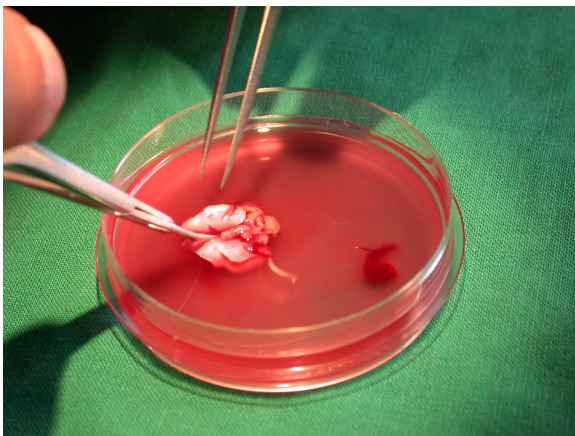


Abbildung 48: Unter Sicht durch das Stereo-Operationsmikroskop wurden in der Petrischale subpleurale Parenchymstücke präpariert.

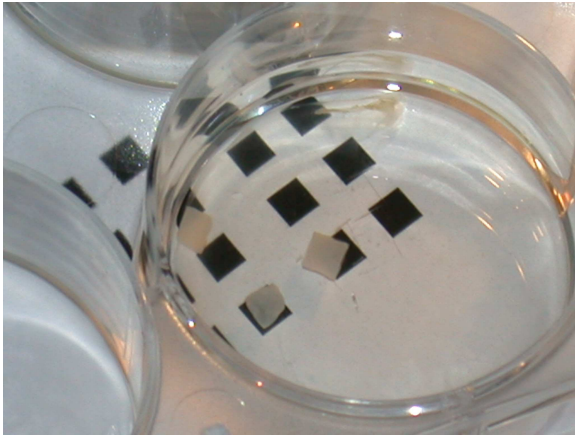


Abbildung 49: Zur Präparation der Lungenstücke wurde eine Schablone mit Kantenlänge 0.5mm verwendet.

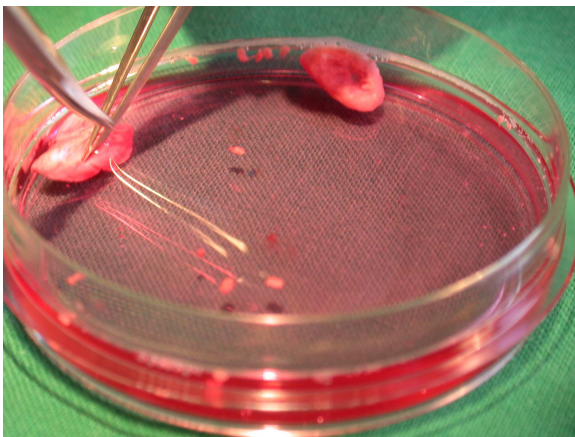


Abbildung 50: Bereits präparierte Lungenwürfel in der Petrischale

4.4.1 Implantation von Lungengewebe in die Rückenhautkammer

Vor der Implantation der Lungenstücke wurde die Maus, die das Gewebe empfangen sollte, nach üblichem Schema narkotisiert und mit der Rückenhautkammer so auf einige Kompressen gelegt, dass die Rückenhautkammer selber in waagerechter Position war. Der Klemmring wurde abmontiert und das Deckglas mit etwas NaCl 0.9% beträufelt, was das Ablösen des Glases erleichterte. Durch Zuhilfenahme einer Nadel und einer Pinzette wurde nun das Deckglas vorsichtig von der Kammer entfernt. Das Gewebe der Rückenhautkammer wurde mit einigen Millilitern NaCl 0.9% gespült und die Flüssigkeit zum größten Teil mit einer Komresse wieder vorsichtig abgesaugt. Mit Blick durch das Operationsmikroskop wurden 3 vorher präparierte Lungenstücke aus der Petrischale einzeln mit der Pinzette sanft entnommen, ohne das Gewebe hierbei zu komprimieren. In dreieckiger Anordnung wurden diese nun auf dem Gewebe der Rückenhautkammer positioniert, so dass die Stücke untereinander den größtmöglichen Abstand hatten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Gewebestücke sich in den oberen zwei Dritteln der Kammer befanden, da das Kammergewebe im Zeitverlauf über die folgenden 14 Tage etwas nach unten sank, und dadurch der ursprünglich unterste

Rand nicht mehr durch das Deckglas ersichtlich war. Ein neues Deckglas wurde mit einer Pinzette gefasst und vorsichtig über der Kammer abgelegt. Wichtig war dabei, dass sich sowohl genug Flüssigkeit unter dem Deckglas befand, so dass sich keine Lufteinschlüsse unter dem Glas befanden, als auch nicht zuviel Flüssigkeit, die dazu führen konnte, dass die Transplantate bei Berührung mit dem Deckglas von ihrer Position zum Rand des Deckglases schwammen. Bei Nichtgelingen wurde dieser Schritt bis zum Erfolg wiederholt. Nach erfolgreicher Applikation des Deckglases wurde der Klemmring mit Zuhilfenahme der Klemmzange wieder so auf dem Deckglas angebracht, dass alle Transplantate gut sichtbar waren und nicht durch den Ring verdeckt wurden.



Abbildung 51: Implantation der ektopen Lungenstücke in die Rückenhautkammer.

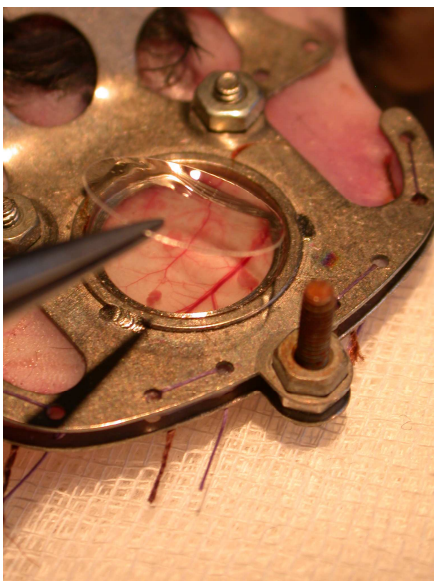


Abbildung 52: Verschließen der Rückenhautkammer mit einem Deckglas

4.5 Gewinnung von Endometriumgewebe

Um Endometriumgewebe zu präparieren, wurde eine weibliche Maus verwendet, die drei Tage zuvor eine Rückenhautkammer appliziert bekommen hatte. Den entsprechenden Versuchstieren wurde das eigene Endometrium entnommen und in die eigene Rückenhautkammer transplantiert. Nach Narkose durch intraperitoneale Injektion von Ketamin/Rompun (wie unter 4.2.2 beschrieben) wurde die Maus zwischen zwei Blöcke auf den Rücken gelegt, so dass die Rückenhautkammer zwischen den Blöcken Platz hatte. Mit einer Pinzette und einer Schere wurde dann eine mediane Laparotomie durchgeführt.

Durch vorsichtiges Auslagern des Darms konnten die weiblichen Geschlechtsorgane gut eingesehen werden. Unter Zuhilfenahme eines Stereo-Operationsmikroskops erfolgte zunächst die Darstellung des Uterus unter vorsichtiger Entfernung des Fettgewebes. Kleinere Gefäßanastomosen zwischen Ovar und Uterus konnten durch Elektrokauterisation verschlossen werden. Nach Ligatur der größeren versorgenden Gefäße mit einem 2.0 Polyethylene-Faden wurde ein Uterushorn mit zwei 2.0 Polyethylene-Fäden legiert, distal davon mit einer Mikroschere durchtrennt, mit einer Pinzette entnommen und anschließend in eine Petrischale (Durchmesser 35mm; Greiner, Frickenheim) transferiert, die 37°C warmes DMEM-Medium (10% FCS; 0,1mg/ml Gentamycin) und den DNS-Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H33342 (200µg/ml; Molekulargewicht (MG) 562; Sigma, Deisenhofen) zur Anfärbung des Transplantates enthielt (siehe Abbildung 55). Anschließend wurde der Bauchraum mit steriler Elektrolytlösung gespült, der Darm wieder reponiert und die Operationswunde mit 5.0 Seide-Fäden in fortlaufender Naht verschlossen. In die Petrischale wurde während der Versuchsvorbereitung ein Stück Korkplatte, das auf 1x2cm Größe zugeschnitten worden war, mit Klebestreifen am Boden befestigt. Nun konnte das schlauchartige Transplantat auf das Stück Kork gelegt und längs mit einer chirurgischen Schere aufgeschnitten werden. Das Gewebe neigte dazu, sich wieder aufzurollen und zusammenzukleben, weshalb ich die 4 Eckpunkte des aufgeschnittenen Präparates mit zuvor krumm gebogenen Nadeln an der Korkplatte befestigte, so dass das Endometrium gut zugänglich war. Während mit der Pinzette das Endometrium hochgezogen wurde, konnte mit der Schere dieses vom Myometrium getrennt werden. Die freipräparierten Stücke wurden in 37°C warmes, Bisbenzimid H33342-freies DMEM-Medium in einer weiteren Petrischale überführt. Unter diese Schale wurde die Schablone mit den schwarzen Kästchen mit 0,5mm Kantenlänge gelegt, um mit deren Hilfe die Endometriumstücke auf mehrere Gewebswürfel mit einer identischen Größe zu bringen (siehe Abbildung 56). Es wurden die zwei am saubersten zugeschnittenen Gewebestücke ausgesucht und für die Implantation verwendet.



Abbildung 53: Zur Entnahme eines Uterushornes wurde die narkotisierte Maus zwischen zwei Blöcken in Rückenlage gebracht, so dass die Rückenhautkammer nicht beschädigt wurde.



Abbildung 54: Darstellung des Uterushornes

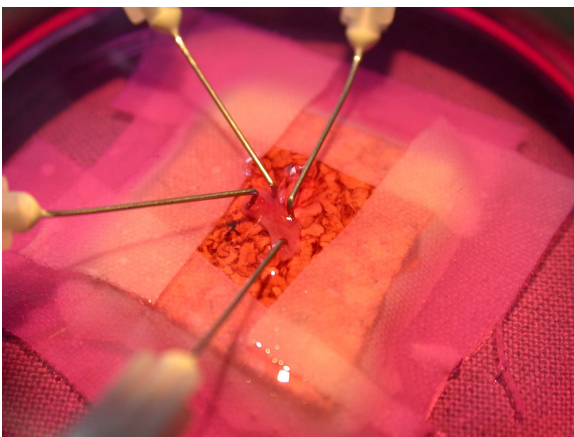


Abbildung 55: Zu sehen ist hier das schlauchartige Transplantat auf das Stück Kork gelegt, längs mit einer chirurgischen Schere aufgeschnitten und die 4 Eckpunkte des aufgeschnittenen Präparates mit zuvor krumm gebogenen Nadeln an der Korkplatte befestigt, so dass das Endometrium gut zugänglich war. Während mit der Pinzette das Endometrium hochgezogen wurde, konnte mit der Schere dieses vom Myometrium getrennt werden.

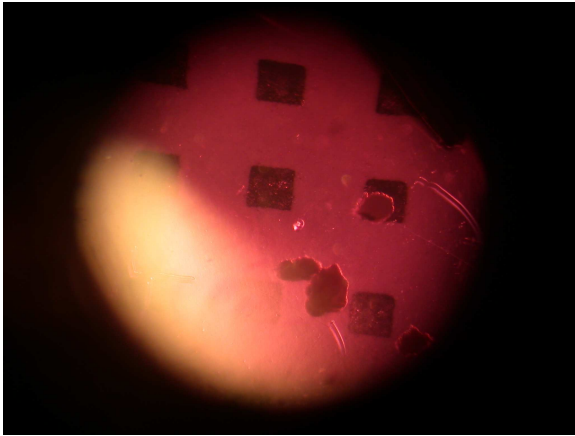


Abbildung 56: Sicht durch das Stereo-Operationsmikroskop auf die Petrischale mit den abpräparierten Endometriumstücken auf der Schablone

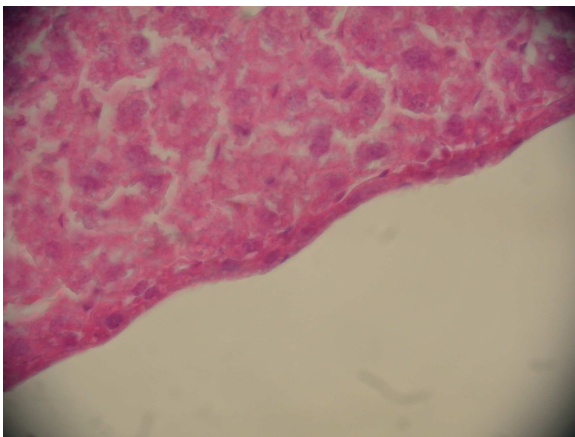


Abbildung 57: Das Endometrium durch das Mikroskop betrachtet

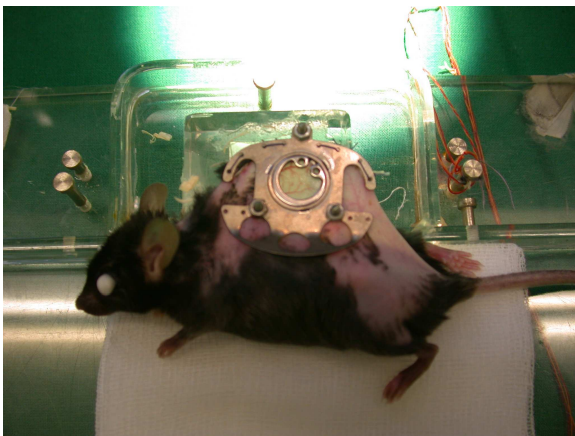


Abbildung 58: Implantierte Endometriumstücke in der Rückenhautkammer

4.5.1 Implantation des Endometriums

Die, durch die zuvor statt gefundene Endometriumentnahme noch narkotisierte, C57BL/6-Maus wurde auf eine runde Korkplatte mit 25cm Durchmesser gelegt, so dass die Maus hin und her bewegt werden konnte, ohne das Tier selbst zu bewegen. Auf diese Weise konnte man je nach Bedarf jeweils die Maus oder aber die Petrischale unter das Operationsmikroskop legen. Unter die Rückenhautkammer wurden einige

Kompressen mit 10cm Seitenlänge gelegt, so dass die Kammer in waagerechter Position war, um mikroskopiert zu werden. Auf das Deckglas wurden einige Tropfen NaCl 0.9% gegeben, so dass sich dieses leichter lösen ließ. Mit einer Pinzette und einer Nadel wurde das Glas entfernt. Die Kammer wurde mit reichlich Kochsalzlösung gespült und die überflüssige Flüssigkeit mit einer kleinen Komresse am Rand der Kammer abgesaugt. Mit einer Mikropinzette wurden möglichst atraumatisch die Endometriumstücke gefasst und in die Rückenhautkammer gelegt. Bei unserer Charakterisierungsversuchsreihe wurden zusätzlich 2 Lungengewebsstücke in dieselbe Kammer implantiert.

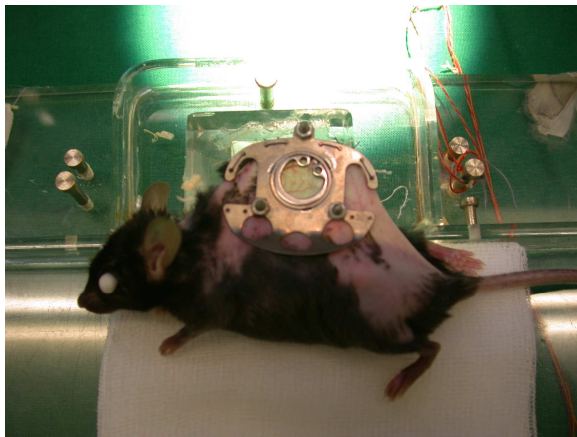


Abbildung 59: Maus mit je zwei implantierten Endometriumstücken und 2 implantierten Lungenstücken in der Rückenhautkammer

Die insgesamt 4 Transplantate wurden in viereckiger Form in der Kammer angeordnet, wobei sich die Transplantate gleichen Gewebes diagonal gegenüber lagen. Es wurde auf möglichst großen Abstand zwischen den Transplantaten geachtet, um ein mögliches Zusammenwachsen zu verhindern. Bei Bedarf wurde zu diesem Zeitpunkt ein Tropfen NaCl 0.9% auf das Gewebe geträufelt. Mit einer Pinzette wurde ein neues Deckglas gefasst und langsam auf der Kammer positioniert. Dabei wurde zunächst eine Seite des Deckglases auf die Kammer gelegt und dann langsam das Glas komplett abgelegt. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen unter dem Deckgläschen befanden, was durch Gabe von mehr Kochsalzlösung verhindert werden konnte. Des Weiteren durfte auch nicht zuviel Flüssigkeit unter dem Deckglas sein, da diese dazu führte, dass die Transplantate beim Ablegen des Deckglases zum Rand der Kammer abweichen konnten (wie unter 4.4.1 für die Lungenstücke beschrieben). Dieses Gleichgewicht zwischen zu wenig und zu viel Flüssigkeit zu finden war manchmal etwas schwierig, so dass der Vorgang mehrere Male wiederholt werden musste. Schließlich wurde dann der Klemmring auf dem Deckglas montiert, so dass das Glas befestigt war.

4.6 Setzen der Ischämie

Bevor die Ischämie um eines der Transplantate gesetzt wurde, wurde eine Leermessung am Intravitalmikroskop durchgeführt, wobei die später ischämische Lunge, die Kontrolllungen, die später ischämische Kammerhälfte und die Kontrollkammerhälfte aufgenommen wurden. (siehe 4.10.4). Aus herkömmlichem Gummi (Fahrradschlauch) wurde mit einem Skalpell eine Halbmondform geschnitten, die für die individuelle Kammersituation passend war. Das heißt, der Gummiring sollte so konzipiert sein, dass er den Blutfluss zu einem der Transplantate gänzlich abschnitt, aber dabei keines der Implantate komprimierte. Die entsprechende Maus wurde mit intraperitonealer Narkose (Ketamin/Xylazin wie unter 4.2.2 erklärt) narkotisiert und auf die Seite gelegt, so dass die Seite der Kammer mit dem Klemmring nach unten zeigte. Dabei wurden unter die Kammer einige Kompressen mit 10cm Seitenlänge gelegt, damit die Kammer horizontal lag. Das Deckglas wurde für die Zeit des Versuches entfernt. Es wurde das Metallstück des Stempels auf den Schaft der oberen Schraube der Rückenhautkammer gesetzt und der Gummiring auf die Rückenhaut der Maus gelegt (die unpräparierte Seite), so dass eines der Lungenstücke von dem Gummiring umrandet war (siehe Abbildung 64). Die richtige Position ließ sich mit Durchleuchtung einfach kontrollieren. Dann wurde innerhalb der Rückenhautkammer gegenüber des Gummihalbmondes am Rand des Kreises der Kammer ein kleiner Gummiwürfel mit ca. 0,5mm Kantenlänge gelegt und über den gesamten Kreis eine runde durchsichtige Silikonplatte (Sonderanfertigung für die Versuchsreihe) angebracht, die in der Mitte eine runde Aussparung auf der oberen Seite hatte, in die die Stellschraube des Stempels passte. Diese Schraube wurde nun so fest gedreht, dass innerhalb des Halbmondes um das ausgewählte Transplantat kein Blutfluss mehr stattfand. Dieses konnte mit einem Blick durchs Intravitalmikroskop bei vorheriger FITC-Gabe retrobulbär sofort kontrolliert werden.

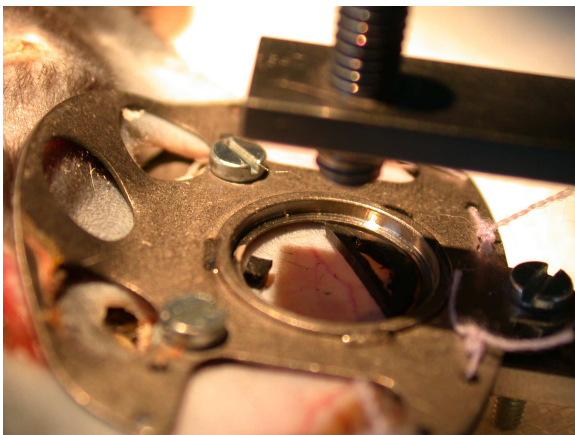


Abbildung 60: Hier sieht man die aus Gummi individuell für jede Kammer zugeschnittene Halbmondform und ein aus Gummi geschnittener kleiner Würfel, der dafür sorgt, dass der Stempel in waagerechter Position aufliegt.

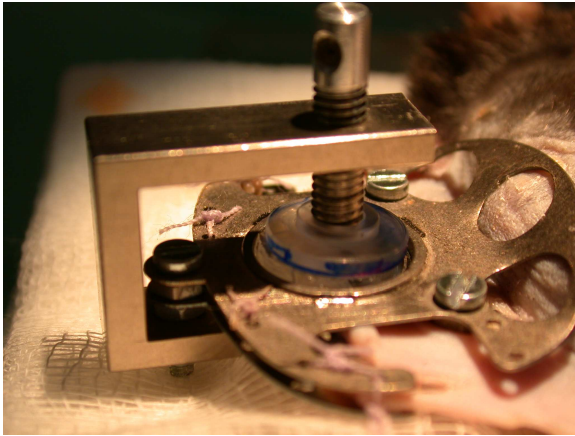


Abbildung 61: In diesem Bild ist die gesamte Stempelanlage zu sehen. Auf den aus Gummi geschnittenen Halbmond kam die runde Scheibe und diese wiederum wurde mit einer Schraube auf die Rückenhautkammer gepresst.

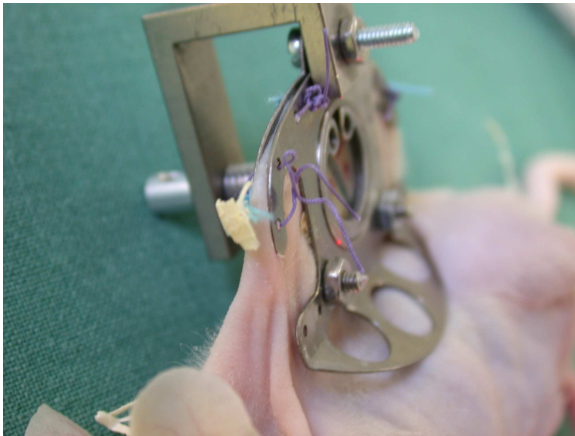


Abbildung 62: Hier ist die Stempelanlage von der anderen Seite dargestellt: Zu sehen ist die Gummi-Halbmondform, die nun aufgrund des Stempelrucks auf die Kammergefäße drückte und so den Blutfluss zu einem der ektopen Lungenstücke unterbrach.

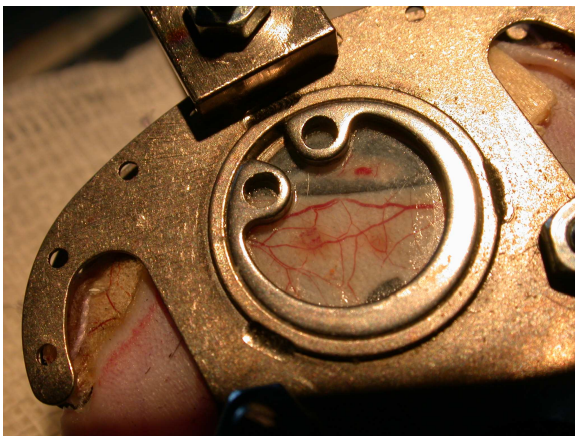


Abbildung 63: Hier nochmals die Ansicht durch das Deckglas auf die Gummihalbmondform. Innerhalb dieser Halbmondform befand sich das nun ischämische Lungenstück. Zu sehen ist, dass die Blutversorgung zu diesem Lungenstück unterbrochen war.

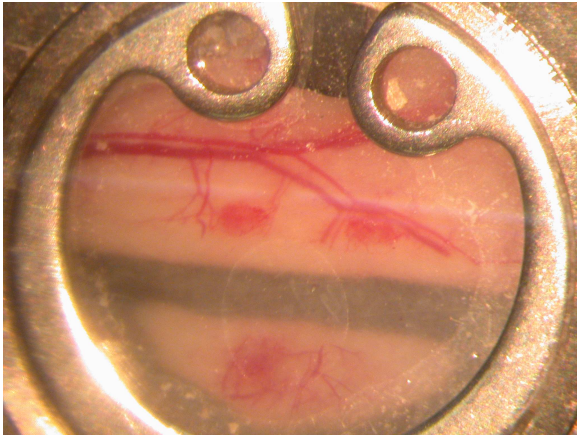


Abbildung 64: Die gleiche Situation etwas näher betrachtet bei einer anderen Rückenhautkammer: Hier ist sehr gut der Unterbruch des Gefäßstroms zu sehen.

4.7 Endotheliale Progenitorzellen (EPC)

4.7.1 Isolation und Kulturbedingungen von endothelialen Progenitorzellen (EPC) aus Ratten-Knochenmark (Kähler et al. 2007)

„EPC wurden aus Femur-Knochenmark von 5 bis 6 Monate alten männlichen Sprague-Dawley-Ratten (220-280 g) isoliert. Aspiriertes Knochenmark wurde mit 1000 U/ml Heparin (Immuno, Wien, Österreich), Deoxyribonuclease I 1000 U/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA) in Dulbecco's PBS (PAA Laboratories, Wien, Österreich) gemischt (Jamur et al., 2001). Die mononukleäre Zellfraktion wurde durch einen Lymphoprep-Dichtegradienten (Nycomed, Asker, Norwegen) durch 30 Minuten Zentrifugation bei 400 x g (GPR, Beckman, Hettich, Deutschland) separiert. Die mononukleäre Zellfraktion wurde abgesaugt, gewaschen und bei 800 rpm während 10 Min. zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde dann in EBM-2-Medium (Clonetics, San Diego, CA, USA) mit 20% fötalem bovinem Serum (FCS, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) suspendiert und in mit Ratten-Fibronectin (10 µg/ml, Sigma, F0635, St. Louis, MO, USA) vorbebeschichteten 12 Well-Platten (Costar, Corning, Niederlande) ausgesät. Nach 24 h wurde die nicht-adhärenzte Zellpopulation aspiriert und in eine neue Fibronectin-beschichtete Platte transferiert. Nach weiteren 24 h wurde dieser Schritt wiederholt, um schnell adhärenzte hämatopoetische Zellen oder reife, möglicherweise im Aspirat vorhandene Endothelzellen auszuschließen. Nur die nicht-adhärenzte Zellpopulation wurde nach 48 h gesammelt und für alle weiteren Experimente benützt. Diese Fraktion wurde in EBM-2-Medium kultiviert, das vascular endothelial growth factor (VEGF), humanen fibroblast growth factor-B (hFGF-B), R³-insulin like growth factor (R³-IGF-1), humanen epidermal growth factor (hEGF), Ascorbinsäure, Hydrocortison, Gentamycin, Amphotericin B (MV-Kit, Clonetics, San Diego, CA, USA) und stem cell growth factor (SCGF, Preproech EC Ltd., London, GB) enthielt. Nach 2-3 Tagen wurden Angioblasten-

ähnliche Zellen beobachtet und ein spindelartiges Auswachsen der Zellen dokumentiert. Nach 7 bis 10 Tagen wurde eine Konfluenz der auswachsenden Zellpopulation erreicht, und die Zellen wurden mit Hilfe von Kollagenase (CLS-CI-22, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) passiert.“(Hamacher, 2007).

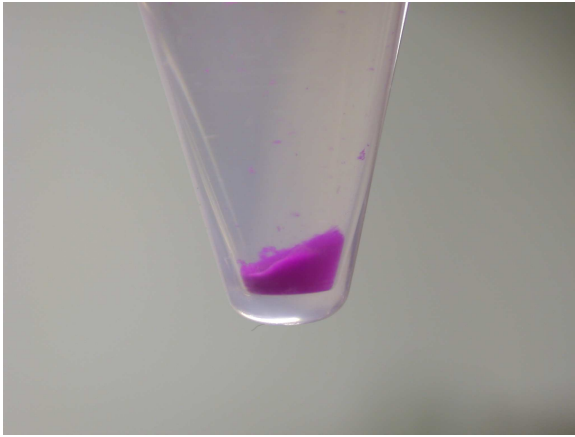


Abbildung 65: EPC im Reagensglas

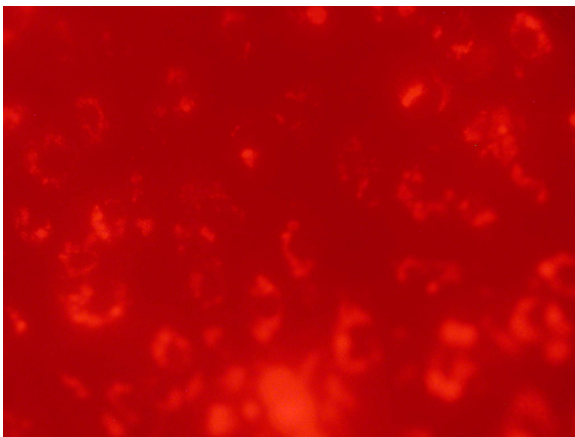


Abbildung 66: EPC durch das Mikroskop betrachtet

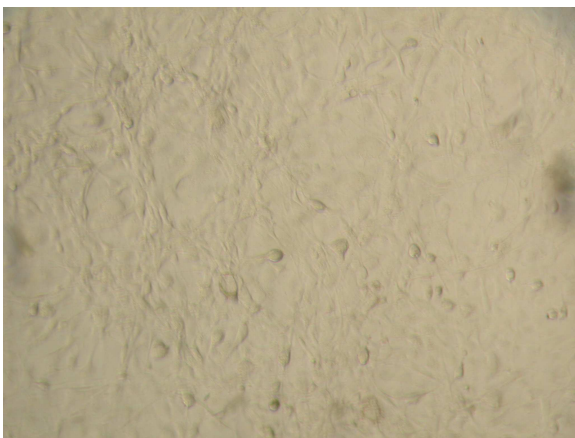


Abbildung 67: EPC durch das Mikroskop betrachtet

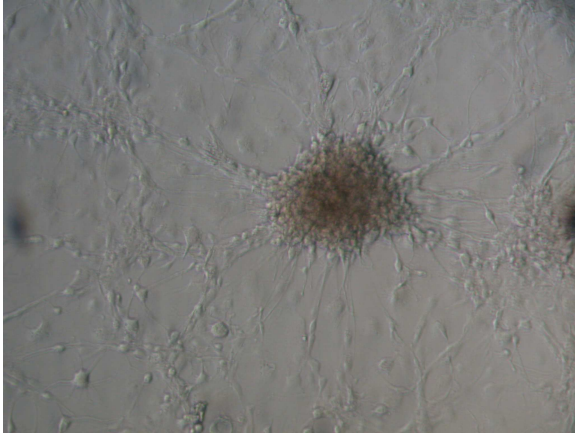


Abbildung 68: EPC durch das Mikroskop betrachtet

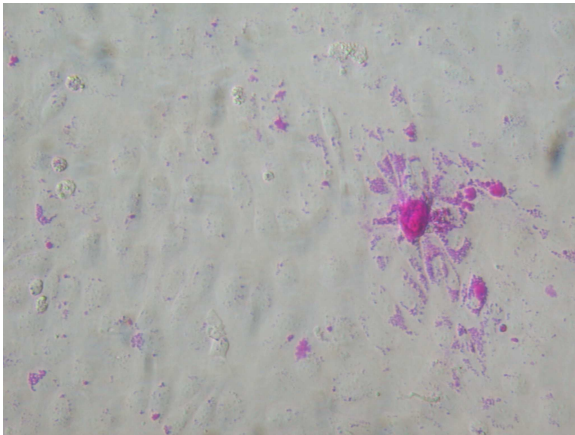


Abbildung 69: EPC durch das Mikroskop betrachtet

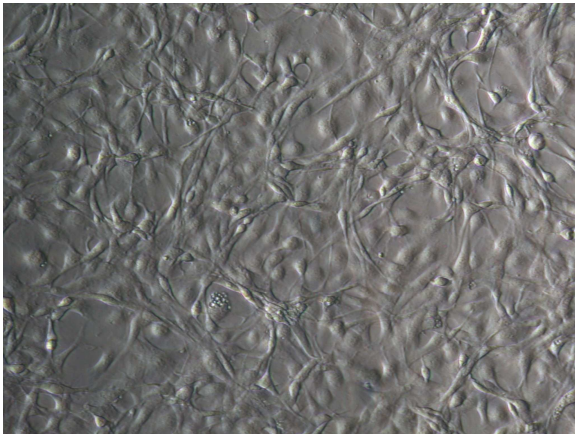


Abbildung 70: EPC durch das Mikroskop betrachtet

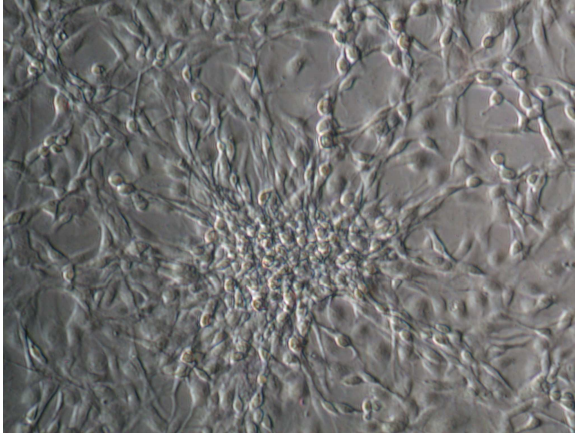


Abbildung 71: EPC durch das Mikroskop betrachtet

4.7.2 Injektion der EPC

Bei der zweiten Versuchsreihe mit Ischämieschaden - nachdem dieser Schaden selber charakterisiert und untersucht worden war - wurden eine Stunde nach Reperfusion intrajugulär die EPC appliziert. Dazu wurden die Versuchstiere in Narkose gelegt, die Vena jugularis frei präpariert und kranial mit einer Ligatur abgeklemmt. An der Ligatur wurde ein Zug nach kranial erzeugt, in dem der Faden an der Unterlage mit einem Klebestreifen fixiert wurde. Die Vena wurde mit einem feinen 22 G Venenverweil-Katheter (Braun, Melsungen) angestochen, der ebenfalls durch einen Klebestreifen auf der Unterlage fixiert wurde, um ihn vor dem Verrutschen zu sichern. Am Ende des Katheters war ein 3-Wege-Hahn angebracht, an dem die Injektionsspritze angesetzt wurde, um die EPC langsam applizieren zu können. Da pro Versuchstier ca. 3ml Flüssigkeit in Form der Stammzellen gegeben werden mussten, was eine sehr große Volumenbelastung für das Tier darstellte, war es wichtig, diese langsam über einen Zeitraum von einigen Minuten zu applizieren. Nach erfolgter Gabe wurde der Katheter vorsichtig entfernt und die Subcutis und Cutis mit einem 4-0-Polyethene-Faden verschlossen.



Abbildung 72: Präparation der Vena jugularis links

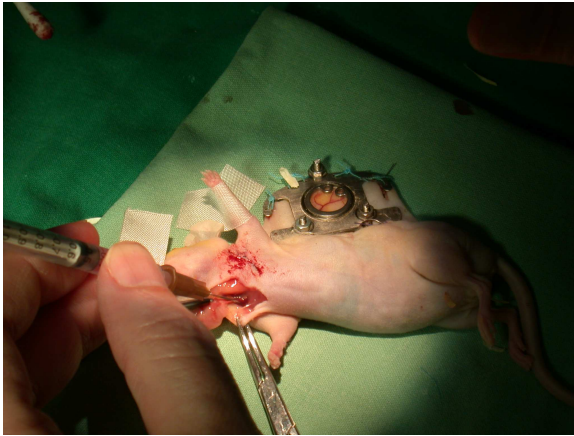


Abbildung 73: Injektion der Stammzellen in die Vena jugularis

4.8 Applikation von subkutanem Matrigel

Bei den Versuchstieren, die später EPC injiziert bekamen, wurde 3 Tage vor der Injektion von EPC jeweils 150µl Matrigel (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) subkutan in die links- und rechtsseitige Flanken-Subcutis zur Analyse der Angiogenese und zum allfälligen Nachweis von Homing von EPC in diese pro-angiogene Matrix appliziert. Die histologischen Schnitte dieser Bereiche sind leider bisher nicht ausgewertet worden, so dass uns hierzu zu diesem Zeitpunkt keine Ergebnisse vorliegen. Die Grundidee, die hinter diesem Versuch steckte, war zu kontrollieren, ob die endothelialen Progenitorzellen, falls sie sich später in der ischämischen Lunge ansammeln, auch hier in dieser pro-angiogenen Substanz ansammeln.

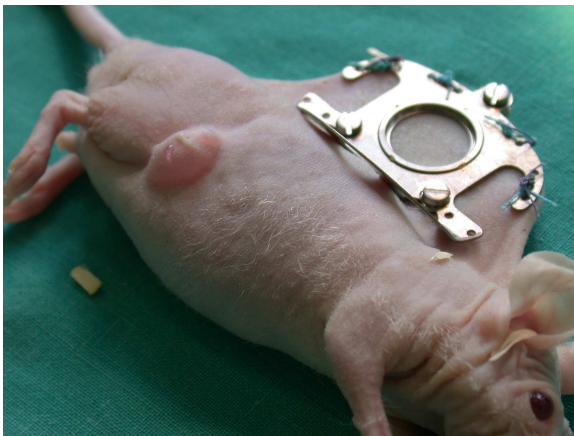


Abbildung 74: 150 µl subkutan appliziertes Matrigel in der rechten Flanke

4.9 Histologie

4.9.1 Histologische Präparate

Nachdem die Versuche abgeschlossen waren, wurden die Mäuse sakrifiziert und die Rückenhautkammern abgebaut. Die präparierte Rückenhaut, die vorher durch das

Deckglas sichtbar war, wurde mit einer Mikroschere rund ausgeschnitten, in ein dafür vorgesehenes Plastikkörbchen gelegt und in 4%-iger Formaldehydlösung bei 4°C für 24 Stunden fixiert. Die fixierten Präparate wurden in Paraffin eingebettet und in Schnitte von 5µm Dicke geteilt. Bei den Versuchstieren, die EPC appliziert bekamen, wurden zusätzlich zur Rückenhautkammer sämtliche Abdominal- und Thoraxorgane entnommen und mit dem gewonnenen Gewebe gleich verfahren und ebenfalls histologische Schnitte angefertigt.

4.9.2 Konventionelle Histologie und Immunhistochemie

Jeder sechste Schnitt der Rückenhautkammer-Präparate wurde nach histologischem Standardprotokoll mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. War auf einem der Schnitte eine Stammzelle zu sehen, so wurden die beiden benachbarten Schnitte für den immunhistochemischen Nachweis des Endothelzellmarkers von-Willebrand-Faktor (vWF) verwendet. Auch die Präparate von ganzen Organen wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Neugebildete Gefäße wurden durch den Endothelzellmarker von-Willebrand-Faktor (vWF) mit Immunoperoxidase-Technik immunhistochemisch nachgewiesen.

Hierzu wurden deparaffinierte Rückenhautkammer-Präparate zur Blockade endogener Peroxidasen für 10 Minuten in 3% H₂O₂ inkubiert und danach mit Pronase (Pronase E; 25mg in 10ml Tris-Puffer 0,05 M; Merck, Darmstadt) für weitere 10 Minuten bei 37°C angedaut. Anschließend erfolgte die Inkubation der Präparate mit einem 1:200 verdünnten Primärantikörper gegen vWF (Rabbit Anti-Human-IgG; Dako Diagnostika GmbH, Hamburg) über einen Zeitraum von 120 Minuten bei 37°C, gefolgt von einem 1:200 verdünnten Sekundärantikörper (Vectastain ABC-peroxidase-kits; Camon Labor-service GmbH, Wiesbaden) zur Streptavidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Färbung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Als Chromogen zum Nachweis der Antigen-Antikörperreaktion diente 3,3-Diaminobenzidin. Nach Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer konnten die Schnitte lichtmikroskopisch beurteilt werden.

4.9.3 Y-Hybridisierung

Die Idee dieses Ansatzes war, festzulegen, ob die neu eingesprossenen Gefäße, die die ektopen Lungengewebestücke mit den Gefäßen der Kammermuskulatur verbinden, von den Gefäßen des Lungengewebes oder von denen der Kammermuskulatur ausgehen. Dazu implantierten wir bei 3 männlichen C57BL/6-Versuchsmäusen in die Rückenhautkammer Lungengewebe einer weiblichen Spendermaus. Bei den histologischen Schnitten dieser Versuchsreihe sollte dann mittels *in situ*-Hybridisierung an den Stellen der neugebildeten bzw. revaskularisierten Gefäße das Y-Chromosom nachge-

wiesen werden. Dadurch, dass das ektope Lungengewebe von einer weiblichen Spendermaus kam, erhielt das Lungengewebe primär keine Y-Chromosomen. Hätten wir innerhalb dieses Areals ein Y-Chromosom nachweisen können, so hätte dies dafür gesprochen, dass die neugebildeten Gefäße aus der Rückenmuskulatur eingesprosst sind. Fehlende Y-Chromosomen dagegen hätten dafür gesprochen, dass die Gefäße aus den transplantierten Lungestücken hervorgegangen bzw. revaskularisiert worden sind. Diesen Nachweis sollten die Kollegen aus dem Humangenetischen Institut in Homburg liefern, was jedoch aus zeitlichen Gründen leider bis zum heutigen Datum nicht erfolgte. Dies könnte jedoch Gegenstand von weiteren Arbeiten in der Zukunft sein.

4.10 Studien

4.10.1 Charakterisierung der Lunge

Zur Charakterisierung von ektopem Lungengewebe in der Rückenhautkammer wurden bei insgesamt 22 C57BL/6-Mäusen (Gewicht 20-30g) beider Geschlechter eine Rückenhautkammer montiert und drei Tage später jeweils 3 subpleurale Lungenparenchymwürfel mit einer Kantenlänge von 5mm in die Kammer transferiert. Zur genauen Beobachtung und Charakterisierung wurden die Lungentransplantate an Tag 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation intravital mikroskopiert. Im 5er Objektiv wurden die Transplantate an jedem der Tage zur Flächenbestimmung gefilmt, im 20er Objektiv wurden mehrere Ausschnitte pro Transplantat über 30sec. aufgenommen, um später offline am Cap Image die Durchmesser der neu gebildeten Gefäße und die dazugehörige Blutflussgeschwindigkeit zu messen. Des Weiteren konnte so die funktionelle Kapillardichte der Transplantate ermittelt werden. Zusätzlich wurden die Anzahl der Leukozyten pro Gefäßdicke und die Apoptoserate ausgewertet.

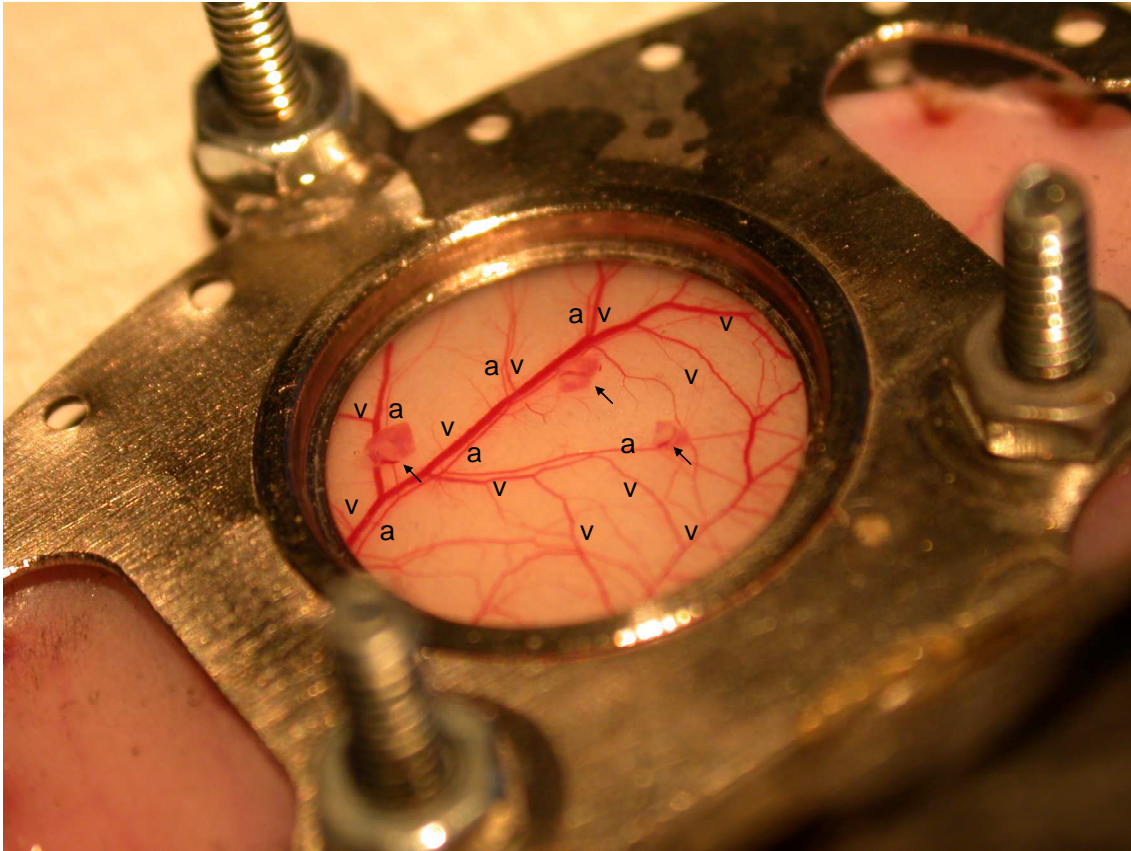


Abbildung 75: Rückenhautkammer mit 3 implantierten Lungengewebsstücken (Pfeile) mit 0.5mm Kantenlänge. Die Rückenhautkammergefäße können leicht in Arteriolen (a) und Venolen (v) unterteilt werden.

4.10.2 Vergleich mit Endometrium

Um das Lungengewebe in der Rückenhautkammer mit einem anderen Gewebe zu vergleichen, wurden in die Rückenhautkammern von 6 C57BL/6-Mäusen jeweils zwei Endometriumstücke und zwei Lungenstücke transplantiert. Endometrium wurde deshalb als Vergleichsgewebe ausgesucht, weil es ein relativ einfach zu entnehmendes Organ ist, für das Versuchstier nicht lebensnotwendig ist und bereits vorher in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass es in der Rückenhautkammer gut anwächst und revaskularisiert. Diese Rückenhautkammern wurden wie die Kammern mit den Lungencharakterisierungen unter 4.10.1 behandelt. Sämtliche Transplantate wurden direkt nach Implantation, 3, 6, 10 und 14 Tage später intravital mikroskopiert und die Parameter Organfläche, funktionelle Kapillardichte, Durchmesser der Gefäße und Blutflussgeschwindigkeit untersucht. Des Weiteren wurde Endometrium in der Rückenhautkammer von 9 weiteren C57BL/6-Mäusen verwendet, um den Hypoxie-Versuch - beschrieben unter 4.10.3 - ebenfalls an Endometriumgewebe durchzuführen (n=4 für die Hypoxie-Serien und n=5 für die 90 minütigen Hypoxien und Hyperoxien).

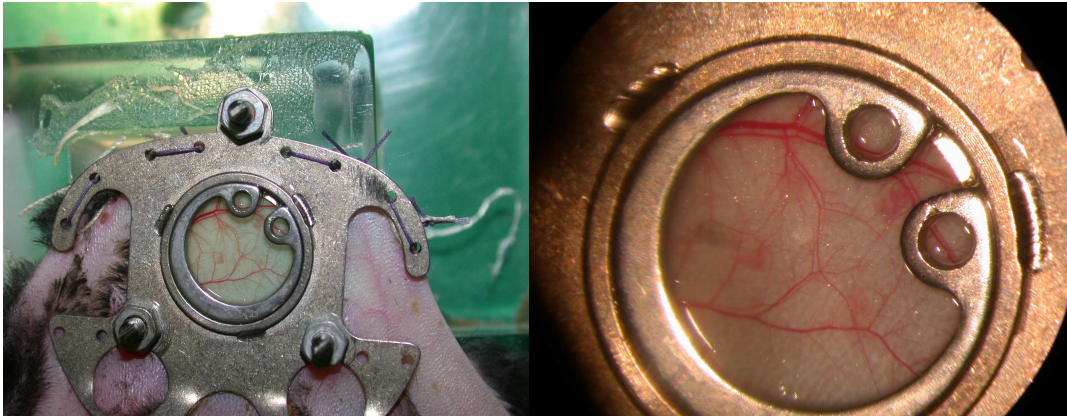


Abbildung 76: Darstellung einer Rückenhautkammer mit 2 Lungenstücken bei 2 und bei 8 Uhr und 2 Endometriumstücken bei 11 und bei 5 Uhr.

4.10.3 Hypoxie-Hyperoxie-Serien

Zur weiteren Charakterisierung des ektopen Lungengewebes in der Rückenhautkammer wollten wir aufzeigen, ob sich die neu gebildeten Gefäße in den ektopen Lungentransplantaten wie Lungengefäße der belüfteten Lunge verhalten, oder ob sie Eigenschaften der peripheren Gefäße annehmen. Dazu untersuchten wir die Vasoreaktivität der Mikrogefäße des Kammergewebes sowie der neu gebildeten Gefäße des Transplantats unter verschiedenen inspiratorischen Sauerstofffraktionen. Als ersten Teil des Versuches führten wir an 9 C57BL/6-Mäusen (n=5 mit je 3 Lungenstücken und n=4 mit je 2 Lungen- und 2 Endometriumstücken) eine Hypoxie-Serie durch: Den narkotisierten Mäusen wurde hierzu unter intravitalmikroskopischer Kontrolle über eine Maske jeweils 10 Minuten lang Sauerstofffraktionen mit 21%, 10%, 15%, 100% und wieder 21% verabreicht. Als zweiten Teil des Versuches applizierten wir 10 narkotisierten C57BL/6-Mäusen (n= 5 mit je 3 Lungenstücken in der Kammer und n=5 mit je 2 Lungen- und 2 Endometriumstücken in der Kammer) an Tag 10 nach Implantation der Lungenstücke in die Rückenhautkammer über eine Gesichtsmaske für 90 Minuten ein Gasgemisch mit 10% Sauerstoff und 90% Stickstoff. Vorher, 10, 30 und 90 Minuten später maßen wir mit dem Intravitalmikroskop mindestens 10 Gefäßdurchmesser und den Blutfluss in denselben Gefäßen, um Gefäßveränderungen über die Zeit feststellen zu können. Dabei druckten wir mit dem Ultraschalldrucker die entsprechenden Bildausschnitte aus und markierten die Gefäßstellen, um bei den folgenden Messungen immer wieder die exakt gleichen Stellen identifizieren zu können. Nach der 90-Minuten-Messung wurde die Maske entfernt und nach 2, 10, 30 und 90 Minuten die Vasoreaktivität bei Raumluft gemessen. Bei diesen Mäusen wurde am kommenden Tag, also 11 Tage nach Lungenimplantation, das Vorgehen mit 100% Sauerstoff anstatt 10% für 90 Minuten wiederholt. Die gleichen Gefäßdurchmesser und Blutflüsse wie am Vortag wurden zu den gleichen Zeitpunkten (0,10, 30 und 90 Minuten nach Sauerstoffgabe) gemessen und

dann nach 2, 10, 30 und 90 Minuten nach Entfernung der Atemmaske. Bei der Hälfte der Versuchstiere wurde genau umgekehrt verfahren und an Tag 10 zuerst 100% Sauerstoff und an Tag 11 10% Sauerstoff gegeben, um ein konsekutives Verhalten der Vasoreaktivität durch den vorangehenden Versuch auszuschließen.



Abbildung 77: Versuchsaufbau Hypoxie-Hyperoxie-Serien: Das Versuchstier lag unter dem IVM mit einer Maske, die an Stickstoff und Sauerstoff angeschlossen werden konnte.

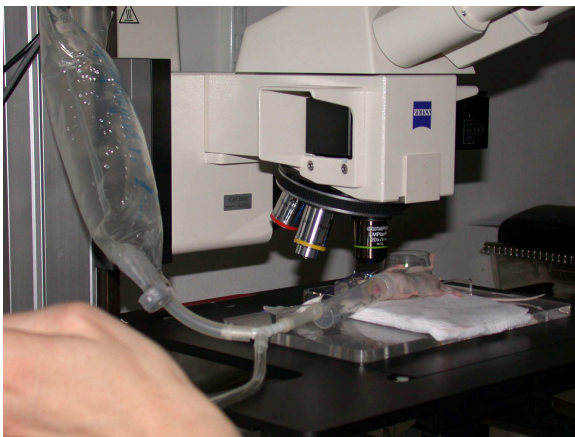


Abbildung 78: Maus unter dem Intravitalmikroskop mit Sauerstoffgabe

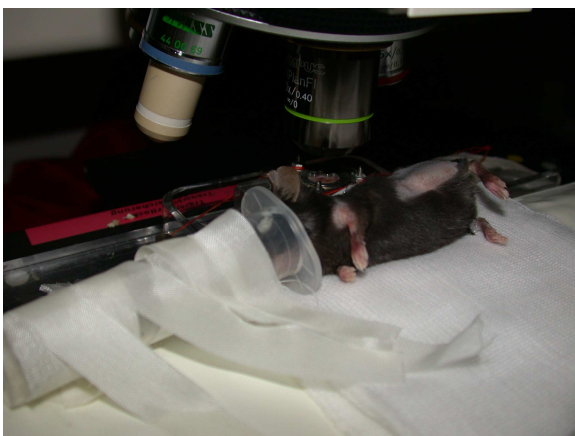


Abbildung 79: Maus mit Beatmungsmaske

4.10.4 Ischämie-Reperfusionsschaden

Um den Ischämieschaden an den Lungentransplantaten zu beschreiben, transplantierten wir in die Rückenhautkammern von 3 C57BL/6-Mäusen (Gewicht 22-26g) jeweils 3 ektope Lungenstücke, um 10 Tage nach Implantation eine Ischämie bei einem der Transplantate vorzunehmen. Um hierbei eine gute Ischämiegröße für den Versuchsaufbau zu erreichen, führten wir bei einer der Mäuse eine einstündige, bei einer eine zweistündige und bei der dritten eine dreistündige Ischämie durch. Intravital mikroskopierten wir dabei vor der Ischämie, direkt nach Reperfusion, 3 Stunden und 24 Stunden nach Reperfusion. Dabei führten wir im 5er Objektiv ein Mapping der Lungenstücke durch, und maßen im 20er Objektiv die Gefäße einmal im FITC-Filter zur Bestimmung von Gefäßdurchmesser und Fluss und zusätzlich im Rhodamin-Filter zur Evaluierung der Leukoadhäsion. Dabei beobachteten wir sowohl die Transplantate als auch die ischämische und die nicht-ischämische Kammerhälfte.

4.10.5 Homing von endothelialen Progenitorzellen

Bei 10 Nacktmäusen (Gewicht 25-35g) und 3 C57BL/6-Mäusen setzten wir eine Ischämie bei einer der 3 Lungenimplantate wie unter 4.6 beschrieben. Die Messungen führten wir nach dem Messprotokoll - unter 4.10.4 erklärt - durch. Bei der ersten Hälfte der Versuchstiere führten wir eine Ischämie von einer Stunde durch und gaben 1 Stunde nach Reperfusion endotheliale Progenitorzellen zusammen mit Tusche in die Vena jugularis. Dazu benutzten wir handelsübliche Tusche von Rotring, die wir 1:10 in HES-Lösung verdünnten. Die Idee bei Benutzung der Tusche war, dass bei den histologischen Schnitten bei auftretenden Kapillarschrankenstörungen schwarze Verfärbungen im Gewebe sichtbar sind. Bei der zweiten Hälfte der Versuchstiere führten wir eine Ischämie von 2 Stunden Dauer durch und gaben 1 Stunde nach Reperfusion 1×10^6 oder 4×10^6 fluoreszenzmarkierte (SP-DilC₁₈(3)) endotheliale Progenitorzellen der Ratte oder des Menschen in die Vena jugularis. Währenddessen und direkt nach dem Vorgang beobachteten wir im Rhodaminfilter im 10er Objektiv die gespritzten Zellen. Durch das Wechseln des Mikroskopfilters zum FITC-Filter bei unbewegtem Bild konnten die Gefäße an den entsprechenden Stellen sichtbar gemacht werden, so dass wir die EPC lokalisieren konnten.

5 Ergebnisse

5.1 Modellaufbau

Das Modell der Rückenhautkammer ist, wie in der Einleitung unter 2.3 beschrieben, ein bereits gut etabliertes Verfahren. So wurden bisher viele Organgewebe oder auch Fremdmaterial innerhalb der Rückenhautkammer untersucht. Besonders die Mikrogefäße lassen sich hierbei sehr gut im Rahmen der Intravitalmikroskopie darstellen.

Unser Versuchsaufbau erwies sich als gut gewählt. Der Bau der Rückenhautkammer hat nach einigen Übungstieren einwandfrei funktioniert. Das Gewebe erholte sich schnell, und so konnten nach 2-3 Tagen bereits die entnommenen Organstücke implantiert werden. Das ektope Gewebe wuchs bemerkenswert schnell an, und so war auch die Durchblutung bereits nach drei Tagen intravitalmikroskopisch gut darstellbar. Die meisten Versuchstiere überlebten bis zur Sakrifizierung an Tag 14 nach Implantation der Organe. Daher konnten zahlreiche Untersuchungen über 14 Tage verteilt vorgenommen werden. Es musste lediglich eine kurze Narkose eingeleitet und die beiden Farbstoffe FITC und Rhodamin retrobulbär appliziert werden, und dann konnten die Gefäße mitsamt den Erythrozyten und auch die Leukozyten sichtbar gemacht werden. Diese Methode funktionierte einwandfrei. Unsere Versuche zur Charakterisierung der Lunge innerhalb der Rückenhautkammer waren damit geglückt. Als nächstes charakterisierten wir wie unter 4.10.4 beschrieben die Ischämie eines der Organe mithilfe des Druckstempels. Im Intravitalmikroskop konnte die Ischämie nachgewiesen werden. Als letzte Versuchsreihe spritzten wir nun endotheliale Progenitorzellen intravenös in die V. jugularis (siehe Abbildung 73) und konnten feststellen, dass diese vermehrt in die ischämische Lunge wandern.

5.1.1 Bau der Rückenhautkammer

Der Bau der Rückenhautkammer wurde von uns, wie bereits etabliert, durchgeführt. Nach wenigen Übungstieren funktionierte dies repetitiv. Es wurde stets die eine Seite der Rückenhaut rund abpräpariert, wie in 4.2.2 genauer beschrieben. Unter mikroskopischer Sicht konnten Hautmuskel, subkutanes Gewebe und Epidermis entfernt werden. Reste wurden ebenfalls mit der Mikropinzette und Mikroschere entfernt. An Tag 2-3 nach Implantation der Rückenhautkammer war das Gewebe schön verheilt und keine Zeichen von Ödem oder Entzündung sichtbar.

5.1.2 Entnahme von Lungengewebe

Wie in 4.4 und 4.4.1 beschrieben wurde einer Spendermaus die Lunge entnommen und innerhalb der Petrischalen präpariert. Systematisch wurde die Pleura vorsichtig entfernt und die dadurch gewonnenen Gewebestücke in einer weiteren Petrischale auf die vorgesehene Größe präpariert. Dies funktionierte wie in 6.1.1.1 erklärt nur annähernd, obwohl mit einer Schablone gearbeitet wurde. Der Vorteil hierbei war, dass pro Versuchsreihe nur eine Maus sakrifiziert werden musste, um Gewebe für mehrere Rückenhautkammern zu gewinnen. Wie wir später im Intravitalmikroskop sehen konnten, war es stets gelungen, das Lungengewebe pleurafrei zu implantieren. Wir wollten speziell dieses, primär pleurafreie, und doch pleuranahe Lungengewebe, da es sich um alveoläres Gewebe ohne zentrale Luftwege handelte. Peripheres Gewebe eignete sich hierfür am besten, da von zentral ausgehend bis zur Pleura gehend immer weniger Gefäße vorhanden waren.

5.1.3 Entnahme von Endometriumgewebe

Dieses Operationsverfahren war etwas schwieriger als das der Lungengewebebegewinnung, da hierbei die Empfängertiere selbst auch die Organspender waren. Leider überlebten einige Tiere diesen Eingriff nicht. Die durch die Operation entstandene Wunde am unteren Abdomen war über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen reizlos.

Das entnommene Uterushorn wurde innerhalb einer Petrischale längs eröffnet und Endometrium abpräpariert. Diese Methode funktionierte sehr gut, und dieser Schritt der Endometriumgewinnung war vergleichsweise einfach, unter anderem, weil hier keine Pleura wie bei den Lungen fein abzupräparieren war. Das Schneiden auf die gewünschte Würfelgröße erfolgte wie bei dem Lungengewebe unter Verwendung der Schablone.

5.1.4 Implantation des Gewebes in die Rückenhautkammer

Dieser Schritt verlief ohne Störungen, auch wenn die richtige Dosisfindung der Kochsalzlösung oft zu multiplen Wiederholungen dieses Schrittes führte. Diese Problematik ist unter 4.4.1 näher erläutert. Dadurch, dass wir den größtmöglichen Abstand zwischen den Geweben innerhalb der Rückenhautkammer wählten, beeinflussten die ektopen Gewebestücke sich nicht gegenseitig und wuchsen nicht zusammen. Dies ermöglichte die jeweils getrennte Beurteilung der Gewebestücke. In ganz wenigen Fällen mussten wir feststellen, dass die Gewebe weiter nach unten und demzufolge außerhalb der Rückenhautkammeröffnung gewandert waren. Dies betraf jedoch meist nur ein, maximal zwei Gewebestücke. Nach den ersten Mäusen bemühten wir uns, die Gewebestücke möglichst weit oben in der Rückenhautkammer zu platzieren, um ein zu

weites Herunterrutschen zu verhindern, was in den meisten Fällen mit Erfolg verbunden war. Die hierdurch entstandenen Ausfälle konnten nicht ausgewertet werden. Die ektopen Gewebestücke wuchsen innerhalb weniger Tage sehr gut an und revaskularisierten so gut wie vollständig (siehe 5.2.3). Dies lässt mich behaupten, dass sich dieses Modell als sehr erfolgreich beim Beobachten von Mikrogefäßen der transplantierten Gewebesorten erwiesen hat.

5.1.5 Intravitalmikroskopie

Diese Methode war ebenso wie das Modell der Rückenhautkammer vorher bereits gut beschrieben und durch die Nutzung von einigen anderen Organen oder anderem Material gut etabliert. Hierbei ließ sich besonders gut die Lunge intravitalmikroskopieren. Es war uns möglich, an den jeweiligen Messtagen die verschiedenen hämodynamischen Parameter wie Organgröße, Blutfluss, Gefäßdurchmesser, revaskularisierte Fläche, funktionelle Kapillardichte, Apoptoserate und Leukozytenanzahl zu messen. Der Blutfluss der Lungenstücke stellte alle bisher gemessenen Blutflüsse anderer Organe in den Schatten. Eine so hohe Geschwindigkeit wurde bis dato noch nicht erfasst (Aussage Prof. M.D. Menger, Direktor Institut für Experimentelle Chirurgie, persönliche Mitteilung 2006). Das Messen der verschiedenen Parameter war an allen Messtagen problemlos möglich. Dadurch, dass sich die Maus in Narkose befand, konnten alle Implantate inklusive des Kammergewebes genauestens untersucht werden. Die Gewebe wurden nach immer wieder den gleichen Kriterien und Schemata untersucht, was einen problemlosen Vergleich ermöglichte. Die Intravitalmikroskopie lieferte uns also sehr gute Dienste und erfüllte ihren Zweck zur Beobachtung des Mikrogefäßsystems.

5.2 Charakterisierung der Lunge und Vergleich mit Endometrium

5.2.1 Implantation von Lungen- und Endometriumgewebe in die Rückenhautkammer

Bei der Charakterisierung der Lungen- und Endometriumgewebestücke in der Rückenhautkammer wurden die Gewebe an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Implantation sowohl makroskopisch als auch intravitalmikroskopisch ausgewertet. Mit der Applikation von FITC-Dextran (5%, 0.1ml; MG 150000; Sigma) wurde das Blutplasma angefärbt, es kam daher zur Kontrastverstärkung. Durch die intravenöse Applikation von Rhodamin-6G (0,1%, 0,1ml; MG 479; Sigma) kam es zur *in vivo* Kontrastierung von Leukozyten.

An Tag 0, also am Tag der Implantation, war ein glatt begrenztes Lungenstück in der Kammer ohne jeglichen Blutfluss sichtbar. Lediglich die Gefäße der Rückenhautkam-

mer schienen unbeeindruckt von der Implantation des neuen Gewebes. Hier war der Blutfluss in toto normal.

Maus Lunge Tag 0

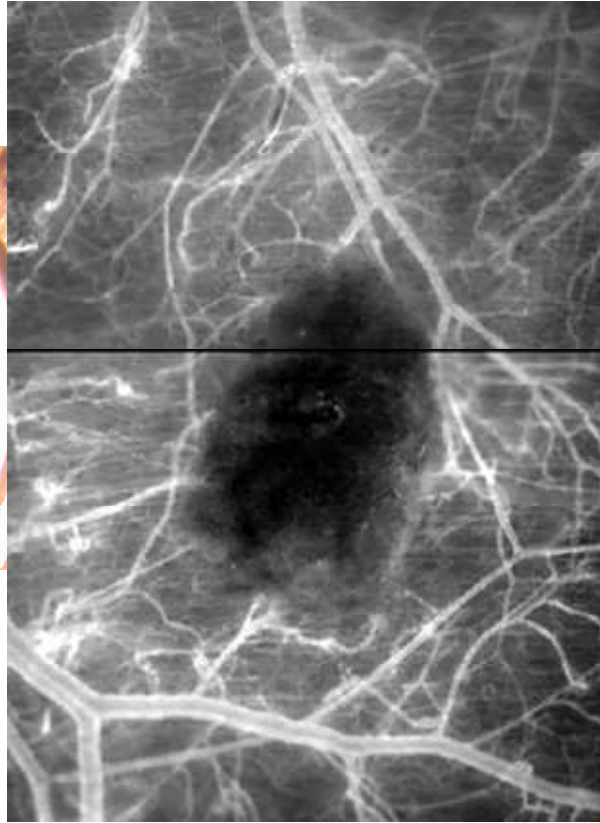
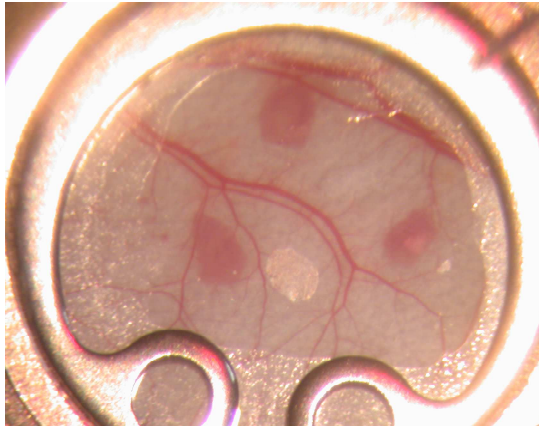


Abbildung 80: Drei implantierte Lungenstücke in der Rückenhautkammer makroskopisch und ein Lungenstück durch das Intravitalmikroskop betrachtet 60 Minuten nach der Implantation

Es kam zu einem Anschluss des pulmonalen Gefäßbettes an die Kammergefäße. Am Tag 3 nach Transplantation fanden sich erste Zeichen der Neoangiogenese in Form von sinusoidal erweiterten Gefäßschläuchen am Transplantatrand mit sehr langsamem Blutfluss, perifokalem Ödem und einer Einblutungstendenz. Die Lungengefäße breiteten sich in das Kammergewebe aus. An Tag 0-3 gelang FITC-Dextran nicht in die Lungenstücke. Es führte allerdings dazu, dass die Kammergefäße gut darstellbar waren.

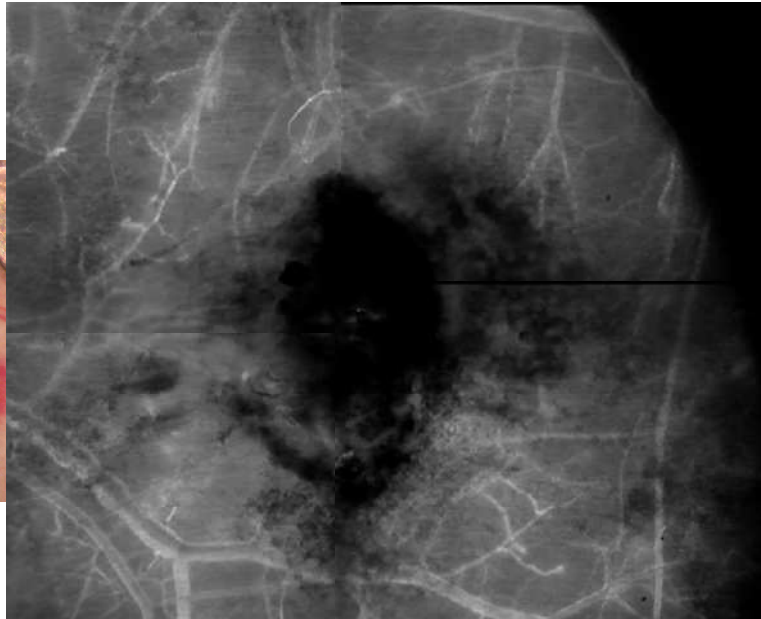
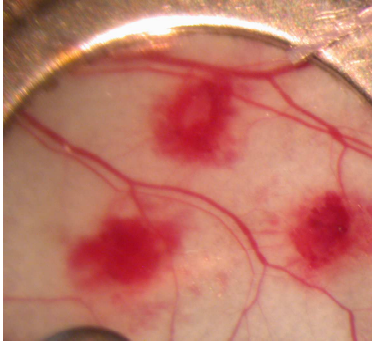
Maus Lunge Tag 3

Abbildung 81: Drei implantierte Lungenstücke in der Rückenhautkammer makroskopisch und ein Lungenstück durch das Intravitalmikroskop betrachtet 3 Tage nach der Implantation: Es waren ein perifokales Ödem und eine Einblutungstendenz auszumachen.

Am Tag 6 nach Implantation war im Lungenstück bereits ein zunehmender Blutfluss darstellbar. Zu diesem Zeitpunkt war bereits mehr als die Hälfte des ektopen Gewebes revaskularisiert.

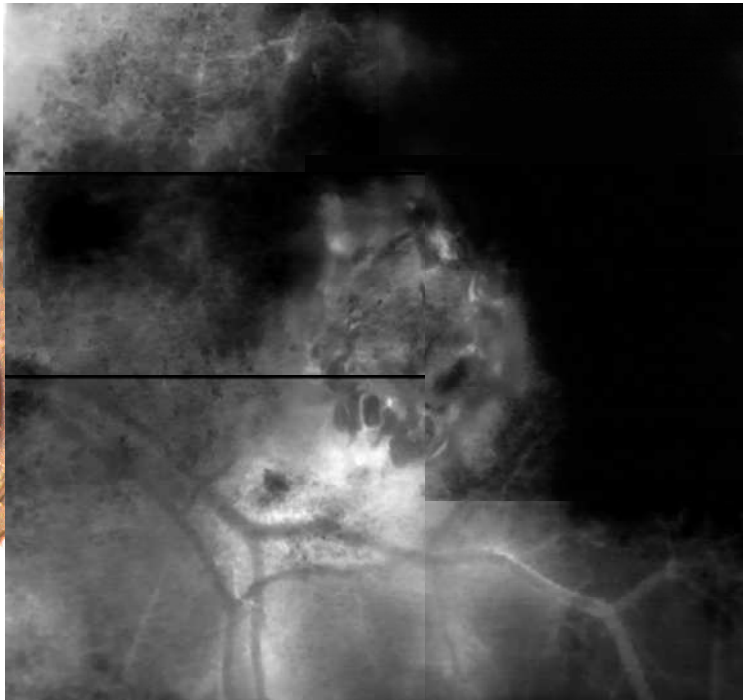
Maus Lunge Tag 6

Abbildung 82: Drei implantierte Lungenstücke in der Rückenhautkammer makroskopisch und ein Lungenstück durch das Intravitalmikroskop betrachtet 6 Tage nach der Implantation: Zu diesem Zeitpunkt war bereits mehr als die Hälfte des implantierten Lungengewebes revaskularisiert.

Bis zum Tag 10 entwickelte sich ein zunehmend dichtes Netzwerk neu gebildeter Mikrogefäße mit irregulären Durchmessern, einer chaotischen Angio-Architektur und deut-

lich erhöhtem Blutfluss. Zu diesem Zeitpunkt waren durch die vielen Verbindungen von Kammer- und Lungengefäßen alle Gefäße der Lungenstücke revaskularisiert.

Maus Lunge Tag 10

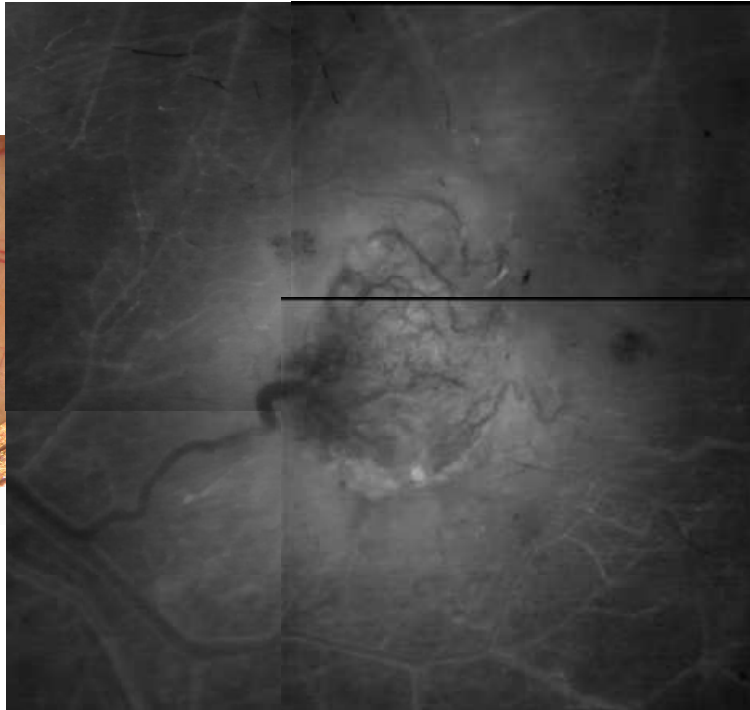
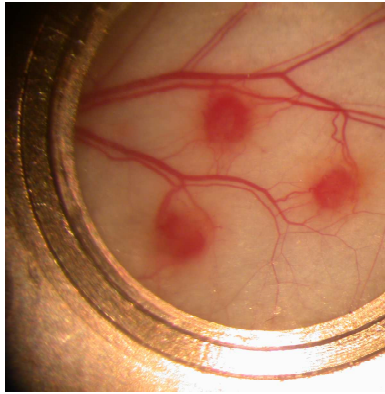


Abbildung 83: Drei implantierte Lungenstücke in der Rückenhautkammer makroskopisch und ein Lungenstück durch das Intravitalmikroskop betrachtet 10 Tage nach der Implantation: Es lag eine chaotischen Angiostruktur mit einem erhöhten Blutfluss vor. An diesem Zeitpunkt waren bereits alle Gefäße des Transplantates revaskularisiert.

In den Endometrium-Transplantaten fand sich ein deutlich erniedrigter Blutfluss. In diesen war die Angio-Architektur glomerulumentartig strukturiert. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass mit diesem Modell die Möglichkeit gegeben war, die pulmonale Mikrozirkulation *in vivo* zu analysieren.

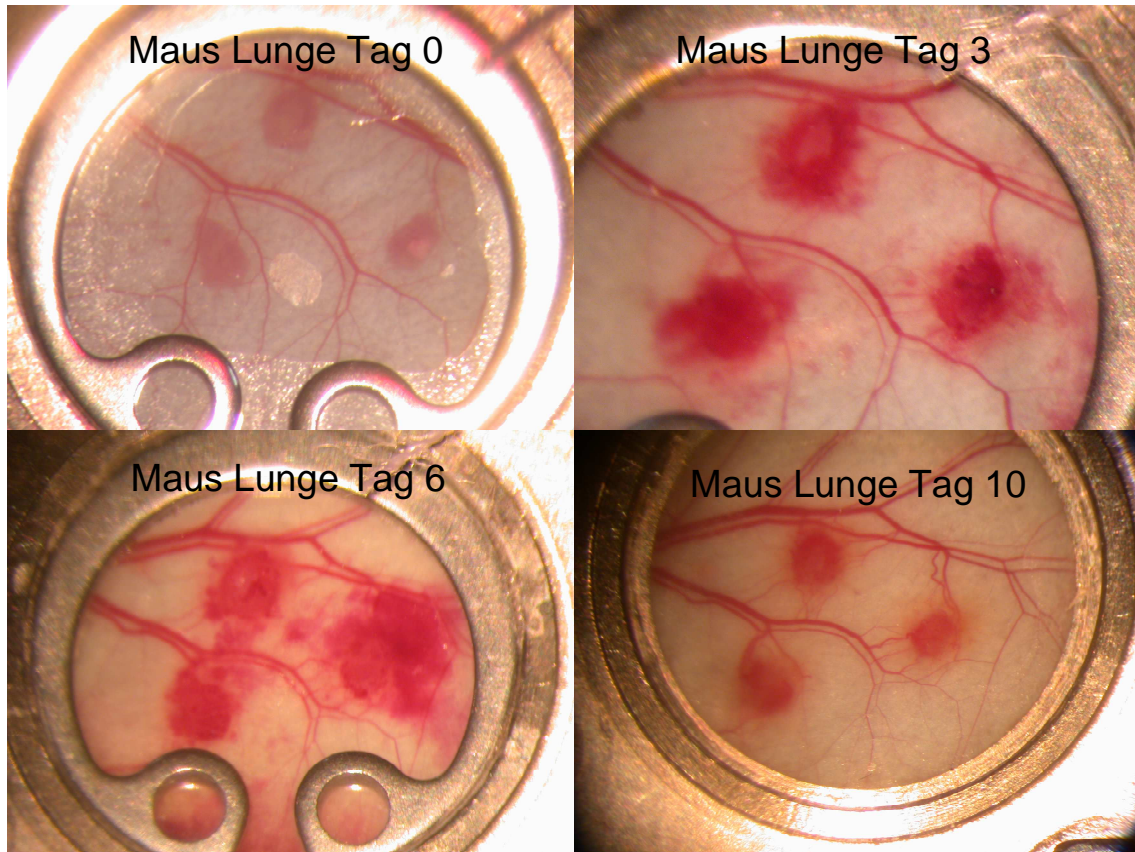


Abbildung 84: Implantierte Lungenstücke in der Rückenhautkammer an den verschiedenen Messtagen zur Übersicht

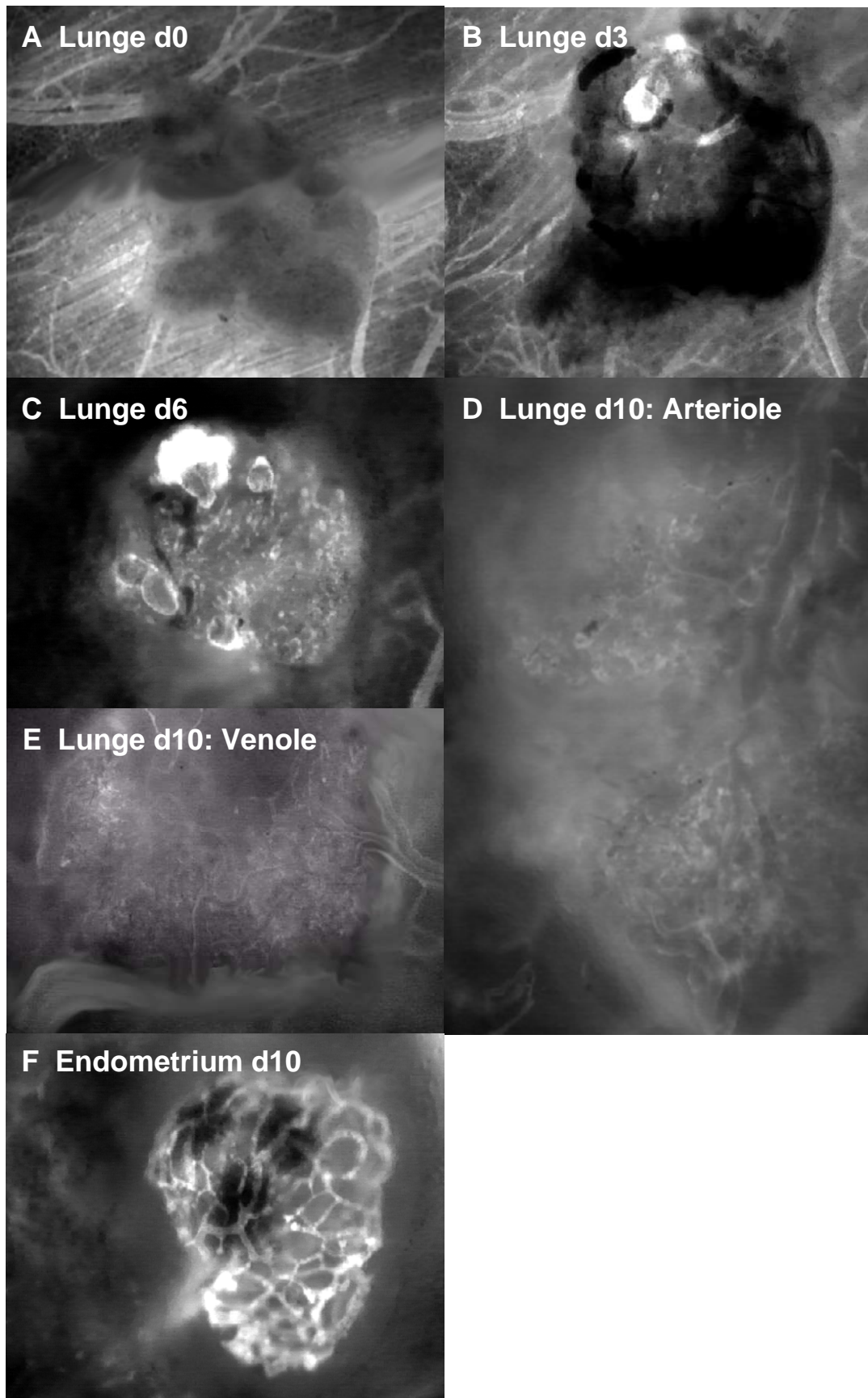


Abbildung 85: A-E zeigen Lunge durch das Intravitalmikroskop betrachtet in der Übersicht von Tag 0 bis 10 nach Implantation. An Tag 10 sind jeweils eine Arteriole und eine Venole (D und E) gezeigt (siehe Diskussion Unterscheidungskriterien 4.3.2). Bild F zeigt ein Gefäßknäuel an Tag 10 beim Endometriumtransplantat.

5.2.2 Organfläche

Die Gesamtfläche der implantierten Organe - sowohl Lungengewebe als auch Endometriumgewebe - hat sich über den Zeitraum von 0-14 Tagen nach Implantation nicht signifikant verändert. Der Zielwert bei der Organentnahme war 1mm^2 . Die realistische Fläche - im Nachhinein im Intravitalmikroskop gemessen - belief sich auf ca. $0.4\text{--}1.7\text{mm}^2$. Mögliche Fehlerquellen dabei waren die mechanische Verformung der Gewebestücke nach Implantation in die Rückenhautkammer durch Druck des Deckglases von oben und das ungenaue Ausschneiden während der Gewebepräparation. Das Ausmessen der Gewebestücke erfolgte innerhalb der Petrischale unter mikroskopischer Sicht mit einer Schere, wobei unterhalb der durchsichtigen Schale eine Schablone mit den Idealmaßen lag. Die pleurafreien Lungenstücke waren zuvor in einer zweiten Petrischale aus der gesamten entnommenen Lunge herausgeschnitten worden, nachdem die Pleura vorsichtig abgetrennt worden war. Dieses Verfahren brachte natürlich Ungenauigkeiten mit sich. Die Abbildung 86 stellt die Verteilung der gemessenen Organflächen dar und lässt darauf schließen, dass diese Größen, sowohl von Lungen- als auch Endometriumgewebe, sich über den Zeitraum von 14 Tagen nicht sonderlich verändert haben. Zu diskutieren wäre hierbei, ob die Implantate ihre Organgröße verändern mussten, um sich in das Empfängergewebe zu integrieren. Die Gefäßdichte und -Länge hatte in diesem Zeitraum bereits signifikant zugenommen. In Abbildung 87, die die Größe der verschiedenen Messtage prozentual im Vergleich zu Tag 0 darstellt, erkennt man eine kaum steigende Linie, die ein minimales Wachstum der Organfläche über die Zeit darstellt.

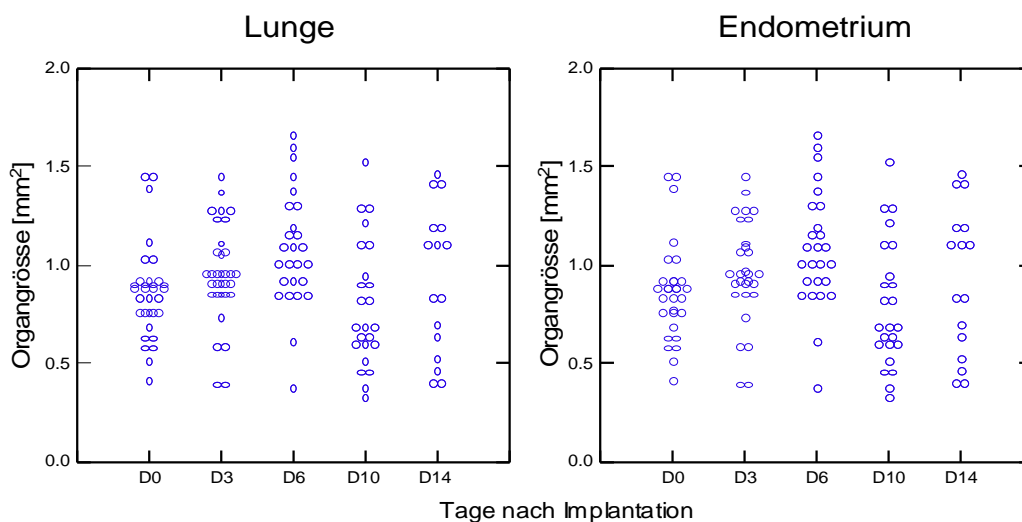


Abbildung 86: Verteilung der absoluten Organfläche von Lunge und Endometrium über 14 Tage (mean und SD)

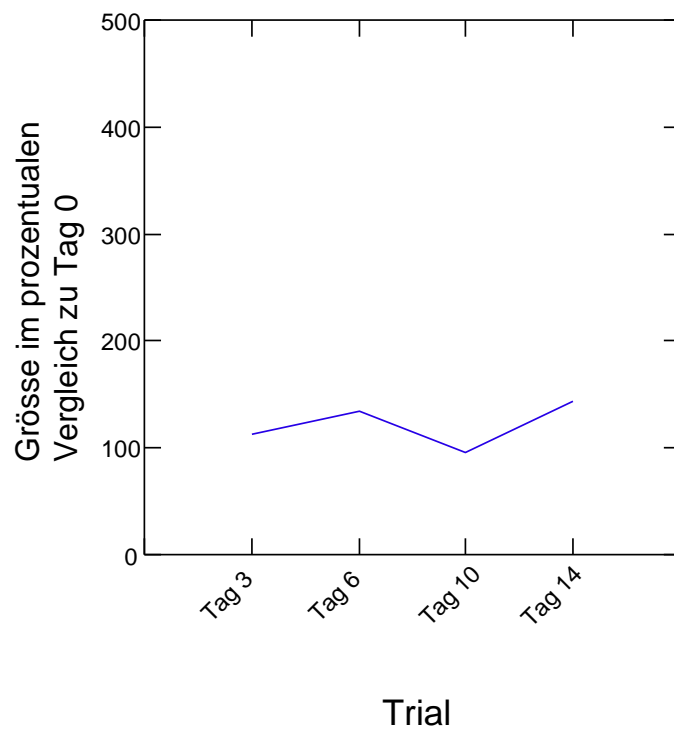
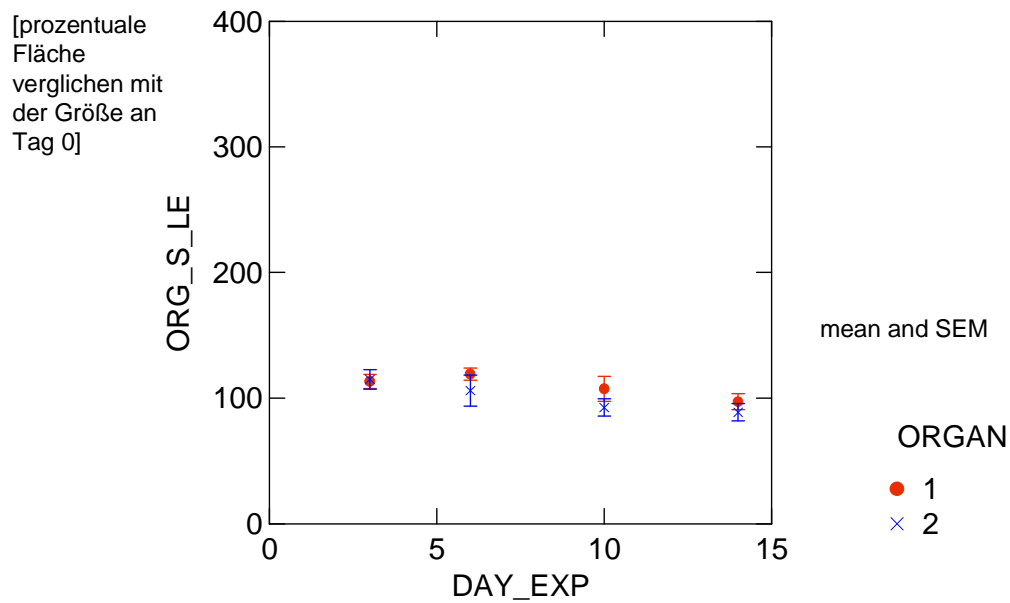


Abbildung 87: Gemessene Gesamt-Organfläche im Intravitalmikroskop über die Zeit im Vergleich mit Tag 0 vom Lungengewebe (mean und SD)



ANCOVA: $p=0.048$ for differences between days, and $p=0.20$ for tissue type

Abbildung 88: Organfläche in Prozent der Ausgangsfläche von Lungen- und Endometriumgewebe über 14 Tage

5.2.3 Revaskularisierte Fläche

In der Abbildung 89, die die revaskularisierte Organfläche der Lunge über den Zeitraum von Tag 3-14 darstellt, sieht man, dass an Tag 3 nach Implantation die allermeisten Organflächen noch nicht revaskularisiert waren, wohingegen an Tag 6 bereits viele der Organe eine revaskularisierte Fläche von $0.6-1\text{mm}^2$ aufwiesen. An Tag 3 betrug die revaskularisierte Fläche anteilig 7% der Gesamtfläche, an Tag 6 nahm diese bereits 58% ein. Innerhalb dieser 3 Tage war folglich ein enormes Gefäßwachstum zu verzeichnen. Von Tag 6 bis Tag 14 stieg diese revaskularisierte Fläche stetig weiter an. An Tag 10 war der Anteil der revaskularisierten Fläche bereits bei bemerkenswerten 94% und an Tag 14 hatten selbst die am wenigsten revaskularisierten Organe eine durchblutete Fläche von mindestens 0.4mm^2 . Der Durchschnitt lag somit bei 99%, was einer kompletten Revaskularisation sehr nahe kommt.

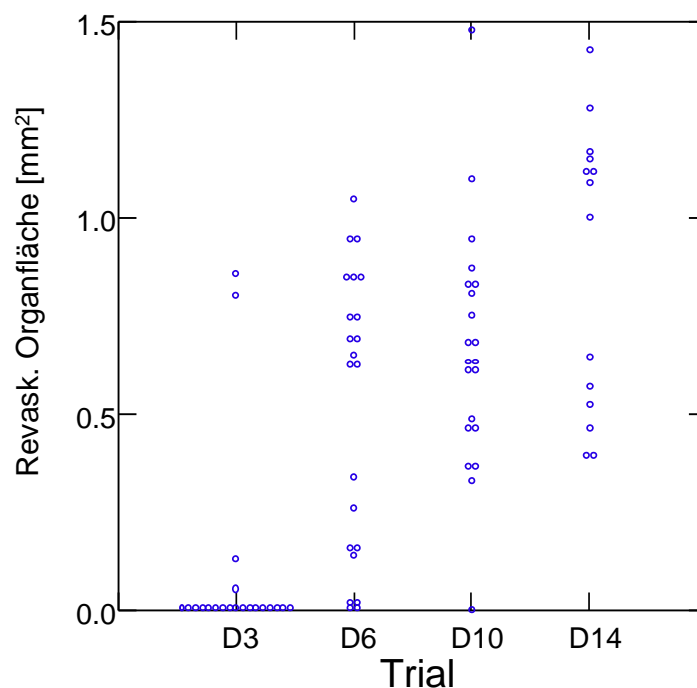


Abbildung 89: Die revaskularisierte Organfläche vom transplantierten Lungengewebe über die Zeit (mean und SD)

Im Vergleich zur Lunge zogen wir die wenigen Exemplare an Endometrium heran, die wir gewinnen konnten (siehe Abbildung 90). Das Endometrium revaskularisierte wesentlich schneller eine große Fläche seines Organs: An Tag 3 waren hier bereits 72% des Organs revaskularisiert, an Tag 6 waren es schon 90% und an Tag 10 und 14 100%. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass das Endometrium wesentlich

früher eine große Fläche seines Organs revaskularisiert, um am Ende der 14 Tage ebenso bei annähernd 100% abzuschließen.

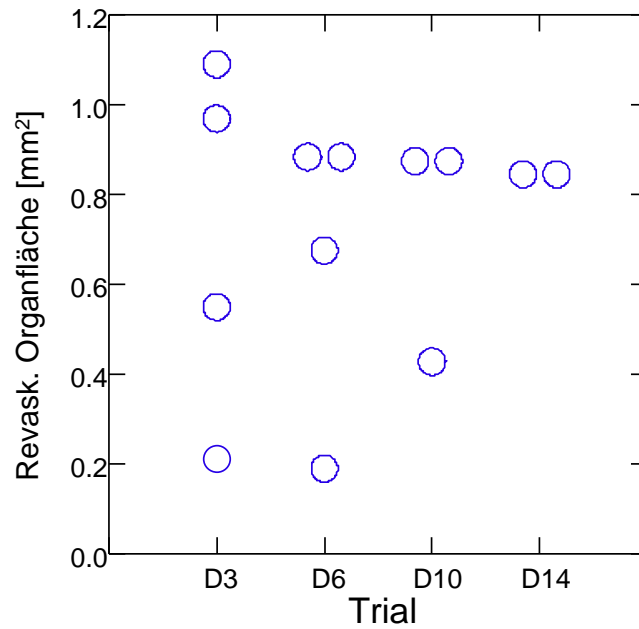
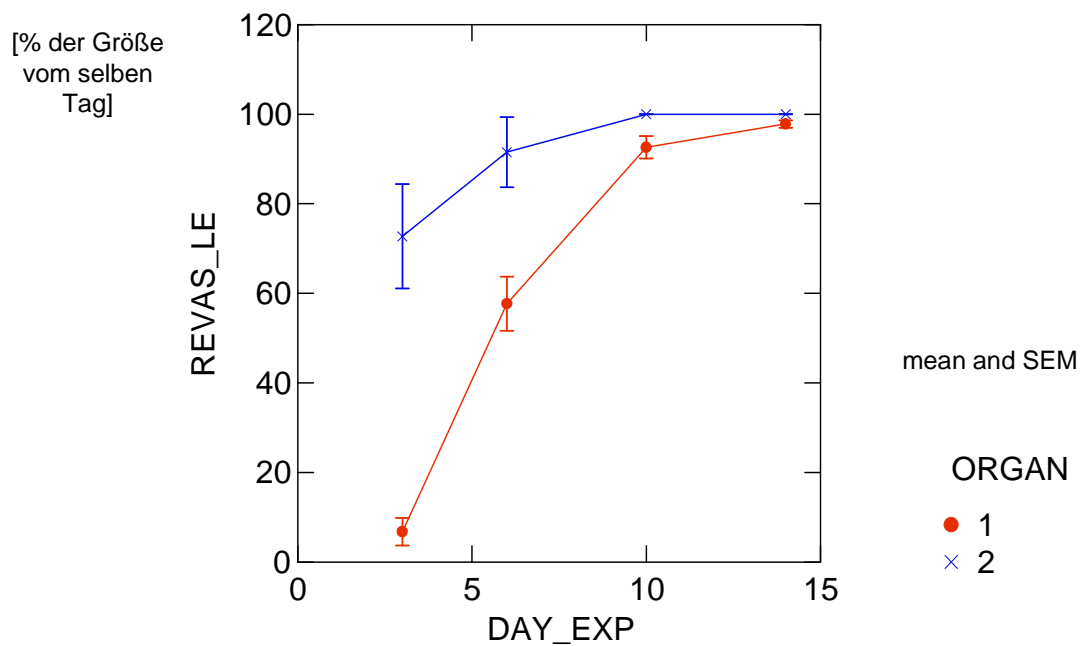


Abbildung 90: Die revaskularisierte Organfläche vom implantierten Endometrium über die Zeit (mean und SD)

Abbildung 91 zeigt die revaskularisierte Fläche in Prozent der Gesamtfläche des jeweiligen Messtages aller gemessenen Mäuse.

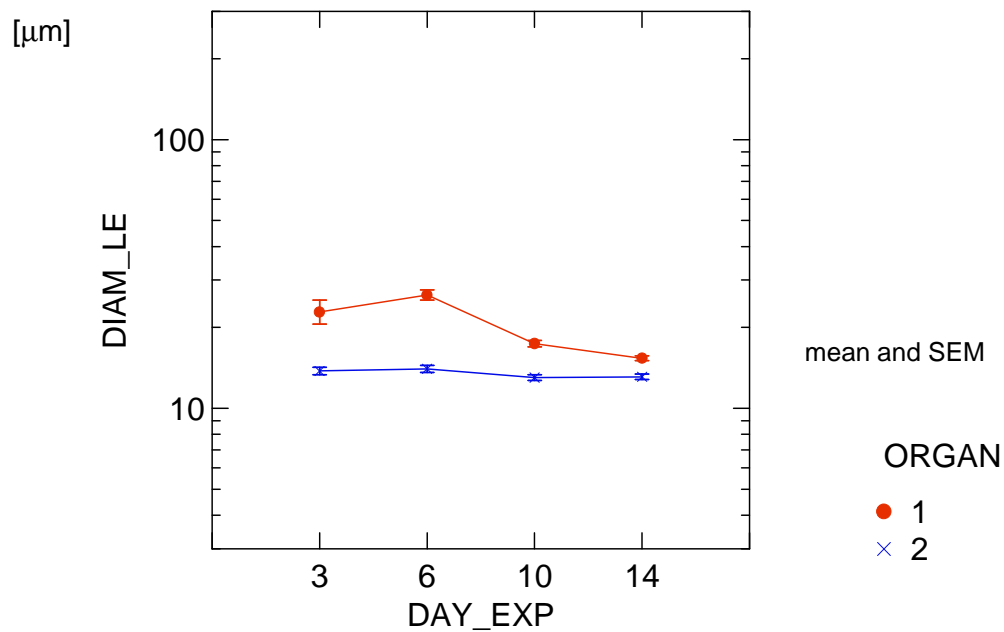


ANCOVA: $p < 0.0005$ for differences between days, and $p < 0.0005$ for tissue type

Abbildung 91: Die revaskularisierten Flächen der Organe Lunge und Endometrium über die Zeit in Prozent der Gesamtfläche des jeweiligen Messtages

5.2.4 Gefäßdurchmesser

Die Gefäßdurchmesser von mindestens 10 repräsentativen Lungen- bzw. Endometriumgefäßen pro Gewebestück wurden jeweils an Tag 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation bestimmt. Dabei wurde von den jeweils identischen Gefäßen ebenfalls der Blutfluss bestimmt. Die Durchmesser der Lungengefäße haben sich über den Zeitverlauf leicht verändert, wobei die Durchmesser der Endometriumgefäße ziemlich identisch über den Zeitverlauf bleiben, wie in Abbildung 92 ersichtlich. Der durchschnittlich gemessene Durchmesser der Lungengefäße war dabei stets etwas größer als der der Endometriumgefäße. An Tag 3 war der durchschnittliche Durchmesser der Lungengefäße $23\mu\text{m}$, der der Endometriumgefäße nur $14\mu\text{m}$. An Tag 6 waren die Endometriumgefäße bei $15\mu\text{m}$ Durchmessern und an Tag 10 und 14 wieder bei $14\mu\text{m}$. Die Durchmesser blieben also weitgehend gleich über die Zeit. Der durchschnittlich gemessene Durchmesser der Lungengefäße an Tag 6 war $27\mu\text{m}$, war demzufolge im Gegensatz zu Tag 3 gestiegen. An Tag 10 betrug er nur noch $19\mu\text{m}$ und an Tag 14 $18\mu\text{m}$. Der Durchmesser der Lungengefäße stieg folglich zunächst an und fiel dann unter den Ausgangswert ab. Die Gründe hierzu sind unter 6.1.1.3 erklärt.



ANCOVA: $p < 0.0005$ for differences between days, and $p < 0.0005$ for tissue type

Abbildung 92: Gefäßdurchmesser in μm von Lungen- und Endometriumgewebe über die Zeit von 14 Tagen nach Implantation

5.2.5 Flussgeschwindigkeit

Die Flussgeschwindigkeit von mindestens 10 repräsentativen Gefäßen pro Lungen- oder Endometriumstück wurde jeweils an Tag 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation gemessen. Hier war ein großer Unterschied zwischen den beiden Organen zu sehen. Wie in Abbildung 93, Abbildung 94 und Abbildung 95 zu sehen ist, stieg der Fluss in den Lungengefäßen über die 14 Tage exponentiell an, während der Fluss der Endometriumgefäße von Tag 3 bis Tag 6 einen fast identischen Anstieg zu verzeichnen hatte und danach jedoch konstant blieb. Während an Tag 3 der Fluss noch durchschnittlich 0.08mm/s betrug, war er an Tag 14 bereits messbar mit 0.19mm/s . Der Fluss war bei jeder Messung wesentlich stärker als bei vorhergehenden Messungen. An Tag 6 betrug er bereits 0.16mm/s und an Tag 10 0.4mm/s . Der Fluss der Endometriumgefäße stieg hingegen wesentlich weniger stark. An Tag 3 war der Fluss ähnlich wie bei den Lungengefäßen 0.09mm/s , stieg bis Tag 6 zu 0.11mm/s , und blieb danach jedoch konstant.

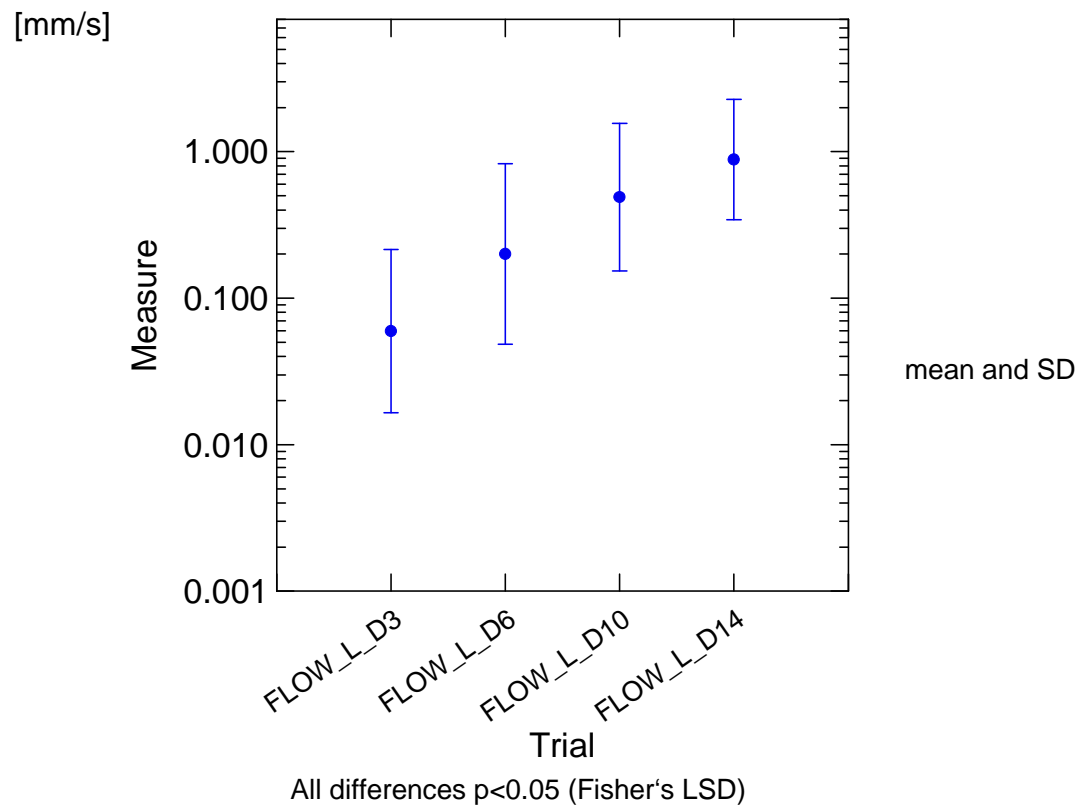


Abbildung 93: Der Fluss der Lungengefäße über die Zeit

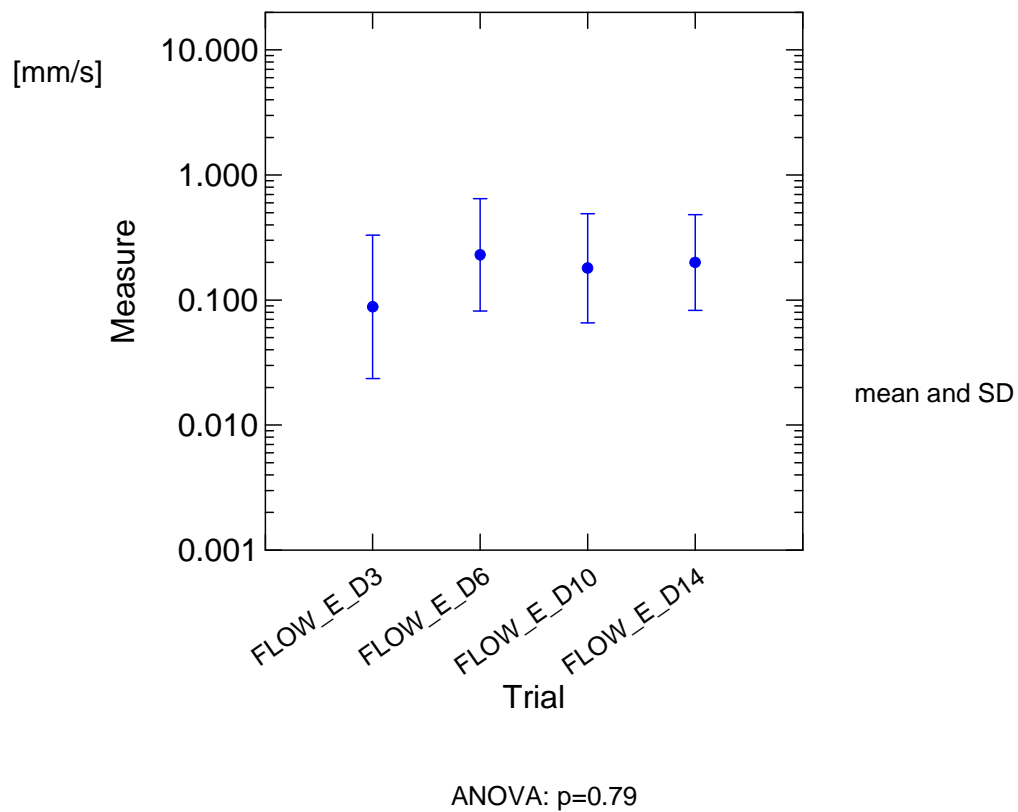
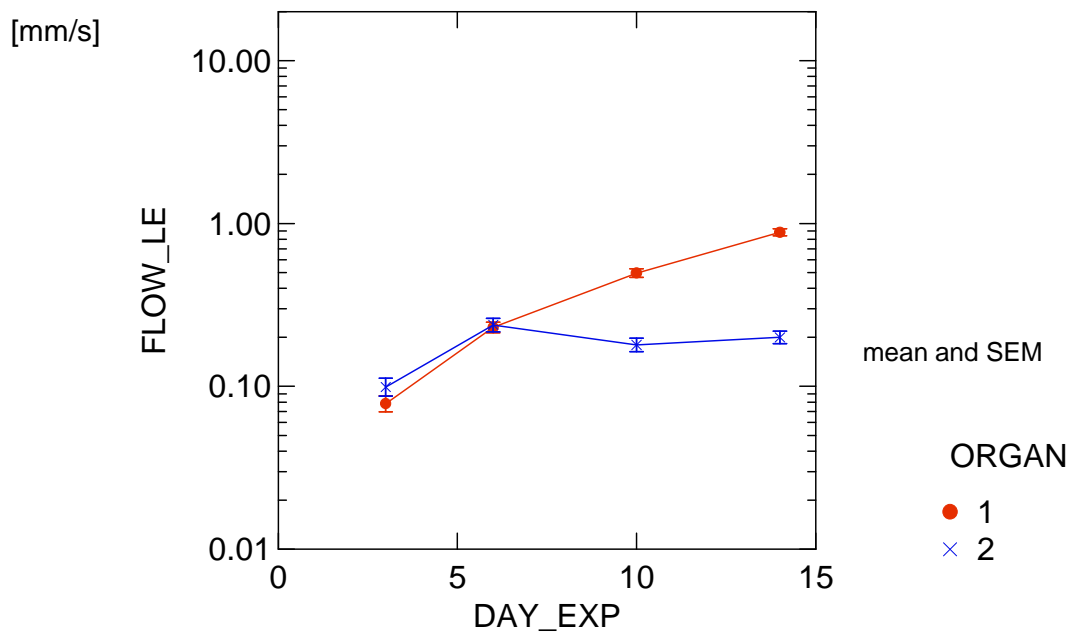


Abbildung 94: Der Fluss der Endometriumgefäße über die Zeit

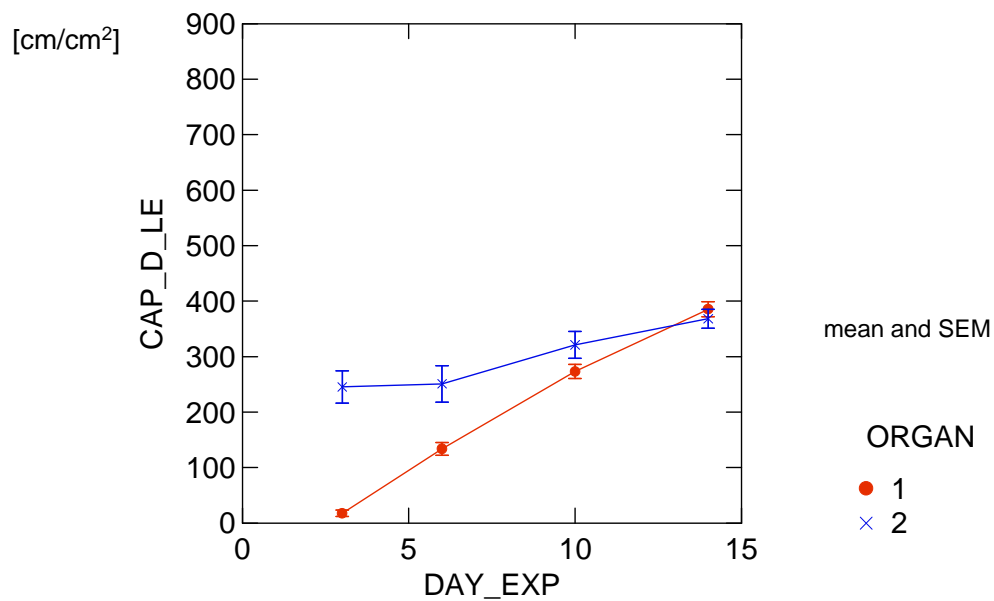


ANOVA: $p=0.79$

Abbildung 95: Der Gefäßfluss in mm/s der Lungen- (Organ 1) und Endometriumgefäße (Organ 2) über 14 Tage: Während der Fluss der Lungenarteriolen stetig anstieg, sistierte er bei den Endometriumgefäßen ab Tag 6.

5.2.6 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte, das heißt der Anteil an Gefäßen, in denen ein fließender Blutfluss dargestellt werden kann, wurde ebenfalls, wie auch die anderen Parameter, über 14 Tage beobachtet. In Abbildung 96 erkennt man über die Zeit einen stetigen Anstieg der Kapillardichte in den Lungenorganen. Während die funktionelle Kapillardichte an Tag 3 fast 0 war, wuchs sie bis Tag 6 auf ca. $120\text{cm}/\text{cm}^2$, bis Tag 10 auf ca. $280\text{cm}/\text{cm}^2$ und bis Tag 14 auf $390\text{cm}/\text{cm}^2$. Unser Vergleichsorgan, das Endometrium, verhielt sich da anders. An Tag 3 nach Transplantation in die Rückenhautkammer war die funktionelle Kapillardichte hier bereits ca. $240\text{cm}/\text{cm}^2$, stieg dann jedoch nur noch wenig an. An Tag 14 war dort die Dichte bei $370\text{cm}/\text{cm}^2$. So waren zwar die funktionellen Kapillardichten der beiden Organe am letzten Tag ähnlich, jedoch kam es bei dem Lungengewebe zu einem enormen Gefäßwachstum, während die Kapillardichte beim Endometriumgewebe weitgehend in dem Maße direkt nach der Transplantation vorhanden war.

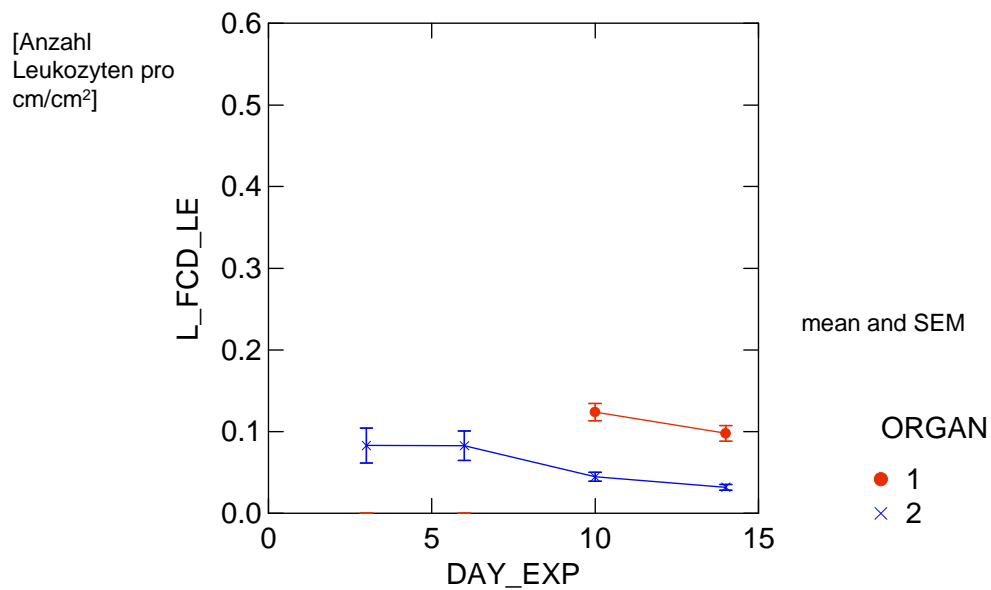


ANCOVA: $p < 0.0005$ for differences between days, and $p < 0.0005$ for tissue type

Abbildung 96: Kapillardichte in cm/cm^2 der Lungen- und Endometriumgewebe an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Implantation

5.2.7 Leukozyteninfiltration

Auch bei der Ansammlung der Leukozyten verhielten sich die beiden verglichenen Organe unterschiedlich. Wie in Abbildung 97 ersichtlich, waren in den Lungengewebsstücken in den ersten Tagen nach Implantation keinerlei Leukozyten sichtbar. Erst an Tag 10 konnten diese ausgemacht werden. Zu diesem Zeitpunkt waren ca. 0.13 Leukozyten pro cm/cm^2 Kapillardichte zählbar. An Tag 14 war die Leukozyteninfiltration zurückgegangen auf ca. 0.1 Leukozyten pro cm/cm^2 funktionelle Kapillardichte. Bei den Endometriumstücken konnte bereits am ersten Messtag - 3 Tage nach Implantation - eine Leukozyteninfiltration ausgemacht werden. Diese betrug an Tag 3 und auch noch an Tag 6 ca. 0.08 Leukozyten pro cm/cm^2 funktionelle Kapillardichte. Bis zu Tag 10 war diese wieder stark abgefallen auf ca. 0.04 Leukozyten pro cm/cm^2 funktionelle Kapillardichte, und an Tag 14 betrug sie nur noch ca. 0.03.

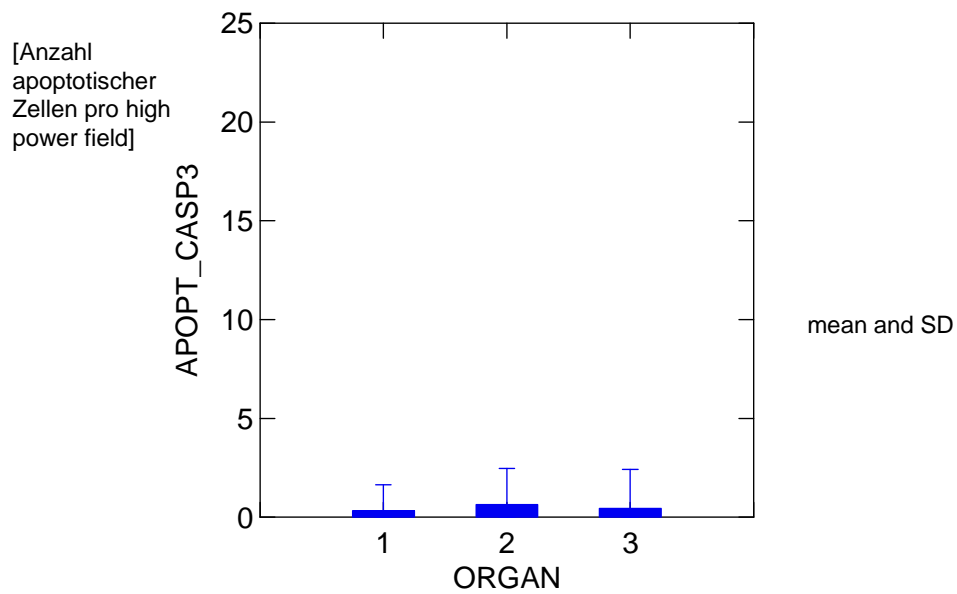


ANCOVA: $p=0.027$ for differences between days, and $p<0.0005$ for tissue type

Abbildung 97: Anzahl Leukozyten pro funktionale Kapillardichte in cm/cm^2 in Lungen- und Endometriumgewebe über 14 Tage; Organ 1= Lunge, 2= Endometrium: Im Organ Lunge waren erst ab Tag 10 Leukozyten darstellbar, die dann bis Tag 14 wieder abfielen. Im Endometrium waren bereits an Tag 3 Leukozyten infiltriert, die nach Tag 6 wieder abnahmen.

5.2.8 Apoptose

Die Apoptoserate steht für das Zellsterben, sie wurde vom Lungen-/Endometrium- und Kammergewebe ($n=1$) immunhistochemisch mittels Caspase-3-Färbung ermittelt. In allen 3 Gewebetypen war die Rate wie in Abbildung 98 dargestellt unter eine Zelle pro high power field im 40er Objektiv, wobei sie im Endometriumgewebe am höchsten und im Lungengewebe im Vergleich am niedrigsten war.



ANCOVA: $p=0.027$ for differences between days, and $p<0.0005$ for tissue type

Abbildung 98: Apoptose pro high power field in 40er Vergrößerung; 1= Lunge, 2= Endometrium und 3= Kammergewebe

5.2.9 Histologie

Wie unter 4.9 beschrieben, wurden am Versuchsende von den Geweben der Rücken-
hautkammern sämtlicher Versuchstiere histologische Schnitte angefertigt. Die lichtmik-
roskopischen Untersuchungen zeigten, dass die Histomorphologie der revaskularisier-
ten ektopen Lungen- und Endometriumgewebe auch nach der Implantation in die Rü-
ckenhautkammer noch erhalten war.

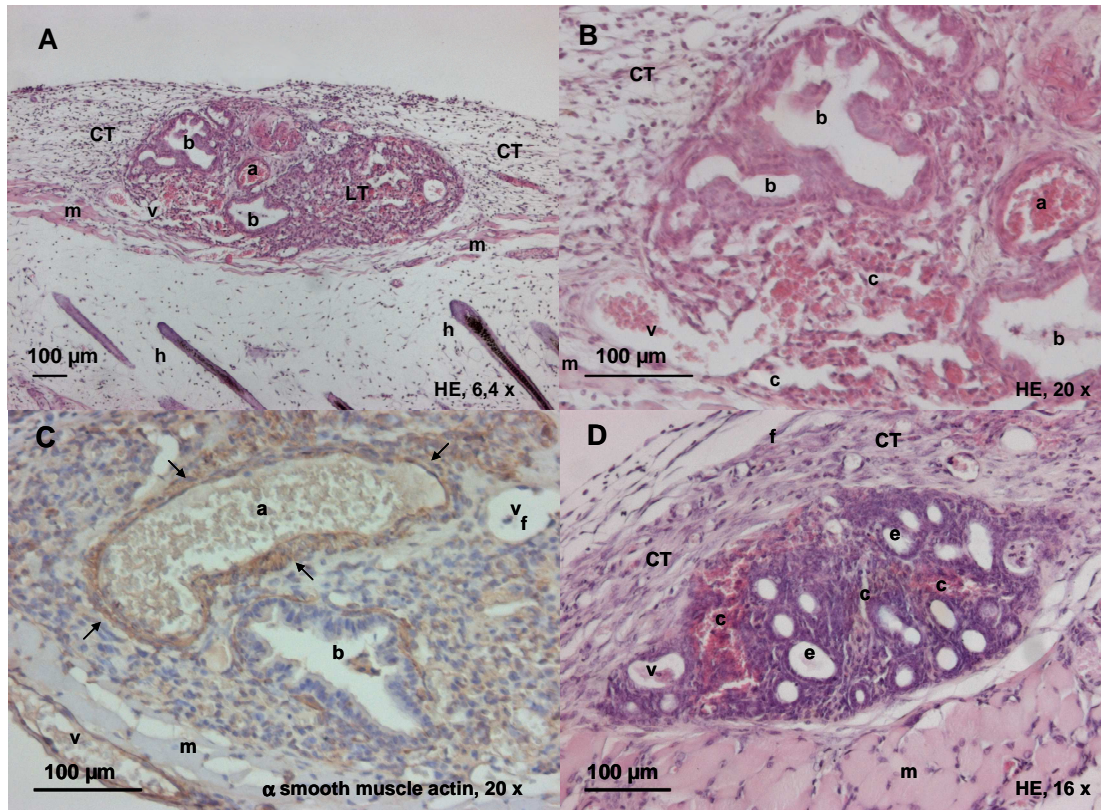


Abbildung 99: a = arteriole, v = venule, b = bronchus, c = capillary, h = hair, m = skin muscle, CT = connective tissue, LT = lung tissue, f = follicle of endometriosis

A + B: HE-Färbung von Lungengewebe 14 Tage nach Transplantation in die Rückenhautkammer einer C57BL/6-Maus. Man beachte, dass die Originalgefäße des Lungengewebes - bestehend aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen - reperfundiert sind.

C: Alpha smooth muscle actin-Färbung des Lungengewebes 14 Tage nach Transplantation in die Rückenhautkammer. Die Arteriole kann von der Venole durch ihre kräftige Wand mit den in ihr enthaltenen smooth muscle actin-positiven Zellen (Pfeile) unterschieden werden.

D: HE-Färbung von Endometriumgewebe 14 Tage nach Implantation in die Rückenhautkammer. Es sind typische zystenähnliche endometriale Drüsen (e) mit stark vaskularisiertem Stroma zu sehen.

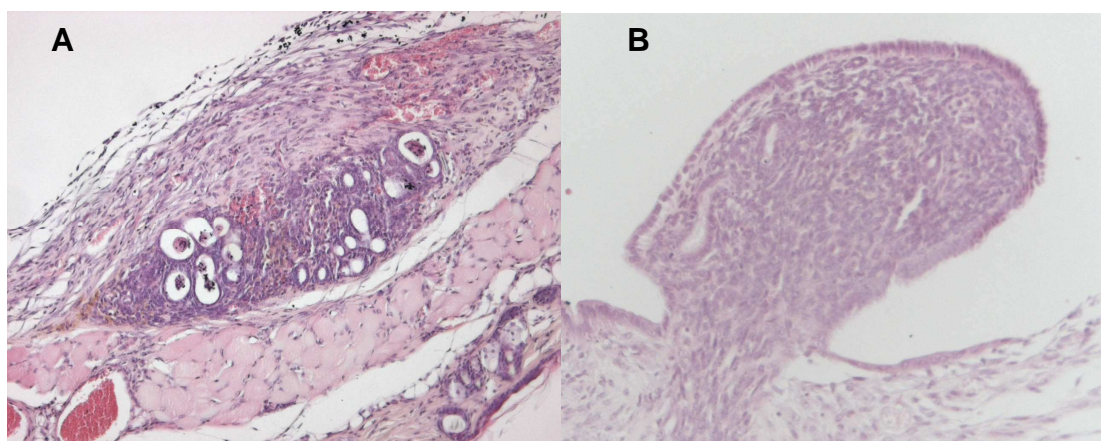


Abbildung 100: Darstellung des Endometriumgewebes an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer einer C57BL/6-Maus. Abbildung A zeigt das Gewebe in 10er und Abbildung B in 20er Vergrößerung.

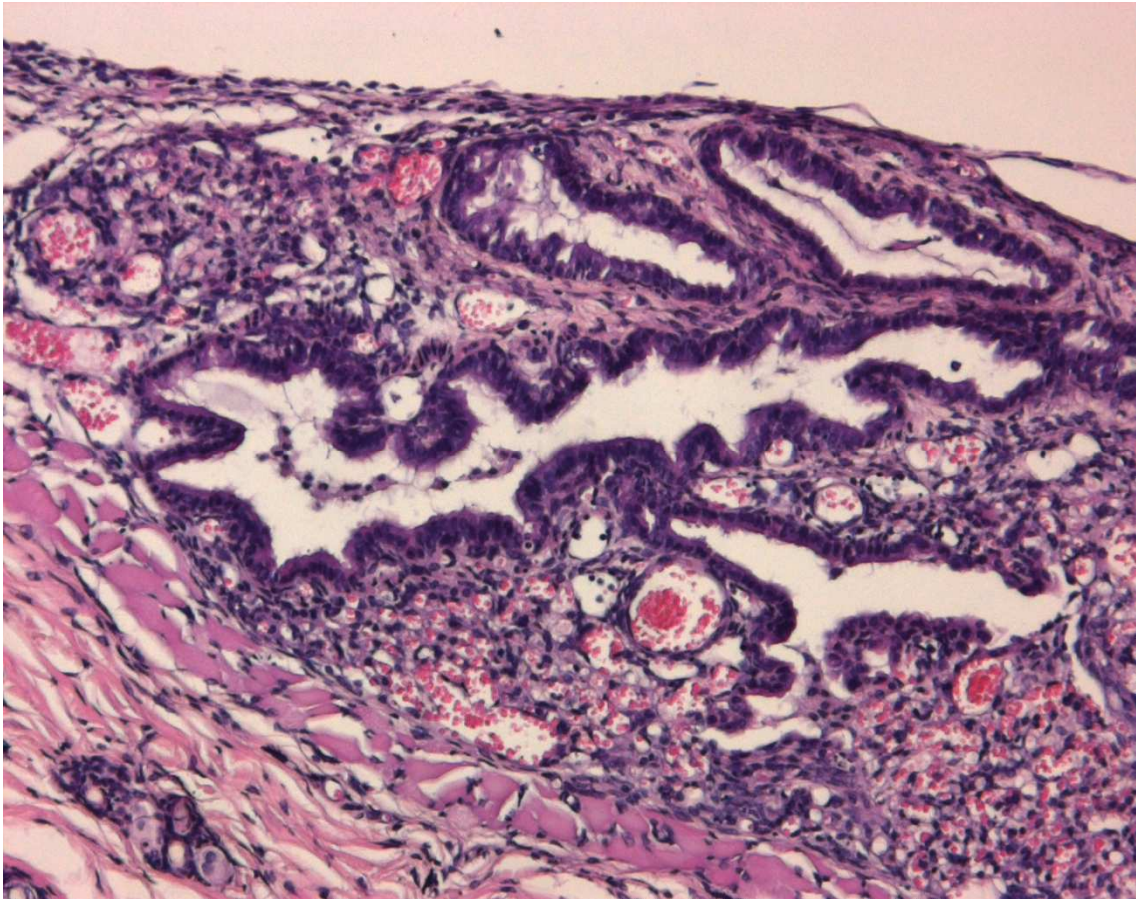


Abbildung 101: Darstellung von Lungengewebe an Tag 14 nach Implantation in die Rückenhautkammer einer C57BL/6-Maus. Vergrößerung 12.5 fach.

5.3 Hypoxie-Hyperoxie-Serien

Bei dieser Versuchsreihe gaben wir, wie unter 4.10.2 erklärt, unterschiedliche Sauerstofffraktionen unter Sichtkontrolle mithilfe des Intravitalmikroskopes über eine Gesichtsmaske. Es zeigten sich die von uns erwarteten Ergebnisse: Es kam zu einer reproduzierbaren Vasokonstriktion der Lungenarteriolen unter Hypoxie mit Reversibilität unter Normoxie bzw. Hyperoxie. Umgekehrt verhielten sich die Muskelarteriolen: Sie dilatierten unter Hypoxie und konstringierten unter Hyperoxie. Der mittlere Durchmesser der Muskelarteriolen stieg beim Wechsel von 21% auf 10% FiO_2 um etwa 16% ($p < 0.006$) und sank hingegen in den Lungenarteriolen des Transplantats um etwa den gleichen Wert ($p < 0.001$). Hyperoxie führte indessen in den Lungenarteriolen zu Vasodilatation ($p < 0.0002$), in Muskelarteriolen zu Vasokonstriktion ($p < 0.0002$). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Gefäße der pulmonalen Transplantate auch nach Vaskularisierung im Muskelgewebe des Empfängers die hypoxisch-vasokonstriktorisches Eigenschaften der pulmonalen Strombahn beibehielten.

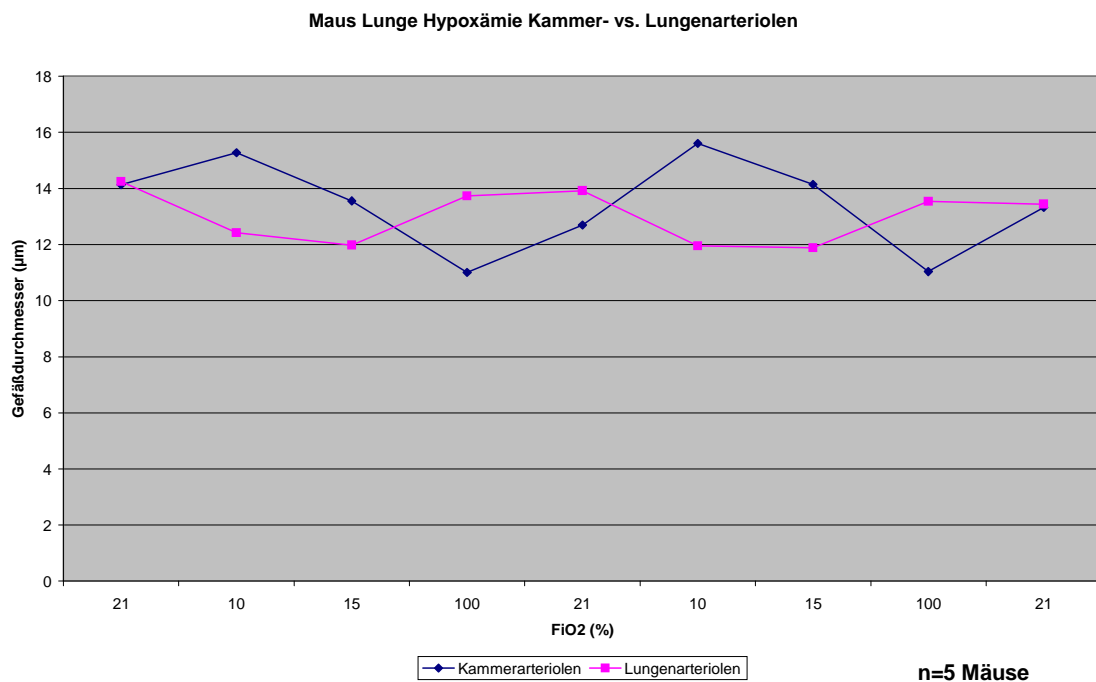


Abbildung 102: Die Gefäßdurchmesser von Kammer- und Lungenarteriolen bei Beatmung der Maus mit verschiedenen Sauerstofffraktionen (auf der x-Achse aufgetragen): Die beiden Arteriolen verhielten sich entgegengesetzt zueinander.

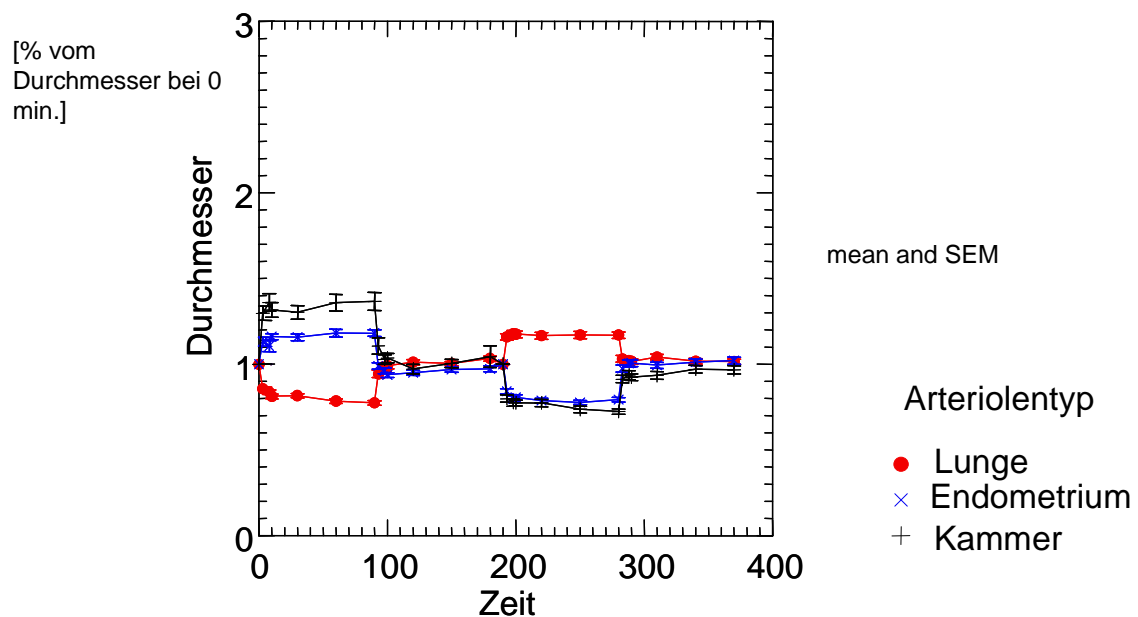


Abbildung 103: Durchmesser der Lungen-, Endometrium- und Kammerarteriolen in Prozent des Ausgangsdurchmessers über die Zeit: Die eine Hälfte der Versuchstiere wurde unter Raumluft, dann 90 Minuten unter Hypoxie mit 10% Sauerstoff und schließlich unter 90 Minuten Normoxie gemessen. Die andere Hälfte der Versuchstiere wurde ebenfalls unter Normoxie beginnend, anschließend über 90 Minuten unter Hyperoxie mit 100% Sauerstoff und dann wiederum für 90 Minuten unter Normoxie gemessen. Diese beiden einzelnen Messungen wurden hier in einem Graph vereint. Es ist gut lesbar, wie Endometrium- und Kammergefäße sich identisch und gegensätzlich zu den Lungenarteriolen verhalten.

5.4 Ischämie-Reperfusionsschaden

Der Ischämie-Reperfusionsschaden, der mit einem Gummiring um das ausgewählte Organ gesetzt wurde, führte zu einer Schädigung des Gewebes mit Ödem. In dem be-

troffenen Organ war während der Ischämiephase kein Blutfluss (wurde im Intravitalmikroskop stets kontrolliert). Man sah, wie das Blut stagnierte oder an manchen Stellen wenig hin und her pendelte. In der nicht betroffenen Seite der Kammer war der Blutfluss davon unbeeinträchtigt. In den Stunden danach entstand nur langsam in einigen Gefäßen ein sehr träger Fluss. In der 24 Stunden-Messung (also 24h nach Reperfusion) waren in dem betroffenen Lungenstück nur noch einige Gefäße sichtbar. Die Peripherie war zu diesem Zeitpunkt so ödematös, dass überhaupt keine Gefäße mehr darstellbar waren. Das von der Ischämie betroffene Gewebe war für viele Tage sichtbar geschädigt. Auch das umliegende Kammergewebe wies ein Ödem auf, das sich nur langsam wieder erholte. Die Gefäßstruktur schien einige Tage nach der Ischämie verändert zu sein, die gleichen Gefäße, die wir vor der Schädigung sahen, waren nicht mehr auszumachen. 3-4 Tage nach der Ischämie unterschied sich intravitalmikroskopisch das geschädigte Gewebe optisch jedoch nicht von den anderen Lungenstücken. Das bedeutete, wenn nicht nach explizit den bestimmten Gefäßstellen gesucht wurde, die vor der Ischämie sichtbar waren, fiel kein Unterschied zu den anderen Lungenstücken auf.

5.5 Homing der endothelialen Progenitorzellen

Die EPC fanden sich 24 Stunden nach Verabreichung hauptsächlich im ektopen Lungengewebe wieder (siehe Abbildung 104). Dabei befanden sich im geschädigten Lungengewebe signifikant mehr EPC als in den nicht geschädigten Lungenwürfeln (Abbildung 106): Direkt nach Injektion der Zellen befanden sich in der ischämischen Lunge 5.23 (1.87) EPC pro cm^2 , 3 Stunden später 6.14 (1.61) und 24 Stunden nach Injektion 7.51 (4.49) Stammzellen pro cm^2 . In der Kontrolllunge waren direkt nach Verabreichung 0.99 (0.51) EPC, 3 Stunden später 1.85 (0.95) und 24 Stunden danach 2.02 (0.71) EPC pro cm^2 zu finden. In dem restlichen Kammergewebe waren zur gleichen Zeit nur vereinzelte bis gar keine Stammzellen auszumachen (Abbildung 105).



Abbildung 104: Die sichtbar leuchtenden EPC in der ischämischen Lunge durch das Intravitalmikroskop dargestellt



Abbildung 105: Nur vereinzelte sichtbare EPC in der Kontrollhälfte durch das Intravitalmikroskop dargestellt

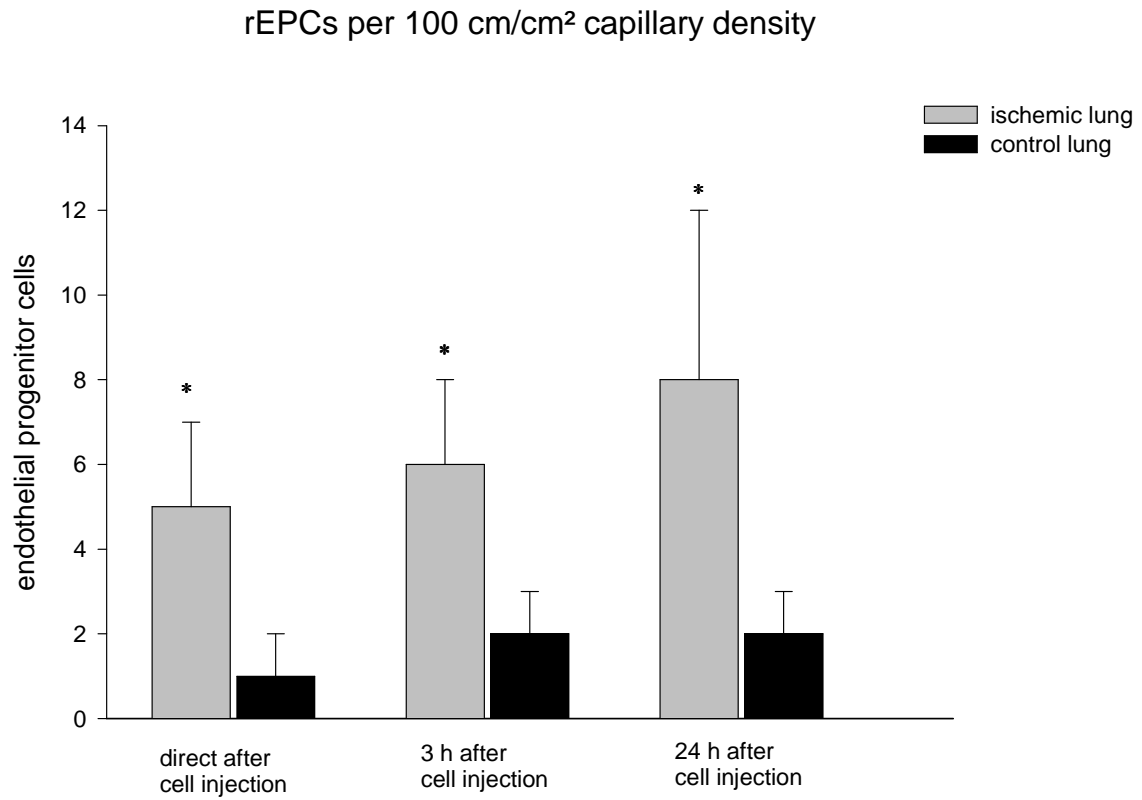


Abbildung 106: Anzahl endothelialer Progenitorzellen in der ischämischen Lunge und der Kontrolllunge (mean and SEM)

6 Diskussion

6.1 Charakterisierung der Lunge und Endometrium

Bei der Charakterisierung des Lungengewebes über die Zeitspanne von 14 Tagen wurden an den Messtagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Implantation der Lunge in die Rückenhautkammer die ektopen Gewebestücke sowohl makroskopisch als auch intravitalmikroskopisch beurteilt. Hierbei sah man, wie stark dieses Organ vaskularisiert ist. Während direkt nach Implantation kein Blutfluss vorhanden war, zeigte das Gewebe schon an Tag 3 erste Zeichen der Neoangiogenese, wie sinusoidal erweiterte Gefäßschläuche, einen langsamen Blutfluss, ein perifokales Ödem und eine Einblutungstendenz. An Tag 6 waren bereits mehr als die Hälfte der Organstücke revaskularisiert, was beweist, wie schnell die Angiogenese in diesem Organ greift. Gegen Ende der Beobachtungszeit entwickelte sich ein zunehmend dichtes Netzwerk an neu gebildeten Gefäßen mit noch irregulären Durchmessern, einer wirren Struktur und deutlich erhöhtem Blutfluss. Es scheint, dass es dabei zu einem Anschluss des pulmonalen Gefäßbettes an die Gefäße der Rückenhautmuskulatur kommt. Der deutlich erhöhte Blutfluss im Lungentransplantat im Vergleich zum Mikrogefäßsystem des Hautmuskels des Empfängertieres oder auch zum Endometrium lässt darauf schließen, dass das Gefäßsystem des Transplantats über eine vom Gefäßsystem der Empfänger-muskulatur unabhängige Vasoregulation entsprechend dem metabolischen Bedarf oder der spezifischen Organfunktion verfügt (Heyder et al., 2006). Beim Endometriumgewebe war wie gesagt ein deutlich niedriger Blutfluss zu verzeichnen, und die Angio-Architektur war nicht so chaotisch wie beim Lungengewebe, sondern glomerulumartig. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Gewebe sich bezüglich der Angiogenese unterschiedlich verhalten.

Unser gewähltes Modell, die Rückenhautkammer, ist also sehr gut geeignet, um die pulmonale (und auch endometriale) Mikrozirkulation über einen Zeitraum von mehreren Tagen *in vivo* quantitativ zu analysieren, denn das ektopy Lungengewebe wächst sehr gut an und revaskularisiert binnen 10 Tagen vollständig. Ein Vorteil dieses Modells ist, dass die Rahmenbedingungen an mehreren Versuchstieren immer gleich gegeben sind. Des Weiteren war es ein bereits vorher gut etabliertes Modell zur Visualisierung von Angiogenese in verschiedenen Gewebearten. Ein weiterer Punkt ist, dass die Messungen der hämodynamischen Parameter wiederholt über mehrere Tage möglich sind im Gegensatz zu in der Vergangenheit durchgeführten anderen Modellen wie z.B. dem Thoraxfenster („thoracic window“). Das frisch präparierte Gewebe in der Rücken-

hautkammer verheilt sehr gut und zügig, so dass bereits nach 48-72 Stunden ektopes Gewebe implantiert werden kann.

Es gibt jedoch auch einige limitierende Einflüsse. Ein einschränkender Faktor ist auf der einen Seite die Anästhesie, die bei zu langer Dauer oder aber auch bei vorher bereits geschwächten Tieren zum Tode des Versuchstieres führen kann. Für die Präparation der Rückenhautkammer, für die Implantation des ektopen Gewebes und auch für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen alle 3-4 Tage wurden die Mäuse narkotisiert. Für manche Eingriffe, wie die Gabe von verschiedenen Sauerstofffraktionen für insgesamt 180 Minuten am Stück für die Hypoxie-Hyperoxie-Serien (siehe 5.3), sind sehr lange Narkosezeiten notwendig gewesen. Bei mehrmaligem Nachspritzen der Narkose kam es bei den Tieren häufig zum Narkoseüberhang, die Tiere wurden wach, doch die akkumulierten Medikamente zeigten noch für Stunden ihre Wirkung. Während der Narkose laufen die Tiere unter Anderem große Gefahr auszukühlen. Davon sind in ganz besonderem Maße aufgrund ihres fehlenden schützenden Felles die Nacktmäuse betroffen. In der vorliegenden Studie wurde versucht, dem Auskühlen durch ein Heizkissen und eine Körpertemperaturüberwachung mit einem Thermometer, was während der gesamten Anästhesiezeit angebracht war, entgegenzusteuern. Hierbei ist das Management der Anästhesie der Kritikpunkt. Die bei der vorliegenden Studie verwendeten langwirksamen Anästhetika sind schwer exakt zu dosieren. Oftmals kommt es zu dem beschriebenen Narkoseüberhang. Idealer wäre es, die Versuche mit kurzwirksamen Anästhetika über eine Maske verabreicht durchzuführen. Hierbei könnte die Narkosetiefe und auch -Länge genau bestimmt werden. Für dieses Verfahren müssten die Laborbedingungen jedoch gegeben sein.

Ein weiterer Kritikpunkt an dem Rückenhautkammermodell ist die Tatsache, dass lediglich ektope Gewebestücke untersucht werden können, eine Untersuchung von Geweben an ihrem natürlichen Ort ist leider so nicht möglich. Es stellt sich hier jedoch die Frage, ob dies zu veränderten Ergebnissen führt. Immerhin konnten wir mit den Hypoxie-Hyperoxie-Serien zeigen, dass sich das transplantierte ektope Lungengewebe wie normales Lungengewebe verhält. Ob der potentiell höhere arterioläre Druck wegen des Einwachsens in die Systemzirkulation methodologische Nachteile bietet, bleibt zurzeit noch offen (Heyder et al., 2006).

In den ektopen Geweben könnten wir daher die Angiogenese hervorragend analysieren, eine Beurteilung von älteren, bereits vorhandenen Gefäßen ist so jedoch nicht möglich.

6.1.1 Messung der hämodynamischen Parameter

Bei der Messung der hämodynamischen Parameter der ektopen Gewebestücke mithilfe des Intravitalmikroskopes lassen sich einige Fehlerquellen diskutieren.

6.1.1.1 Organfläche

So war zum Beispiel die angestrebte Zielfläche der implantierten Lungenstücke 1mm^2 , die später intravitalmikroskopisch gemessen wurde. Hierbei maßen wir Werte von $0.4\text{--}1.7\text{mm}^2$ Fläche. Für diese Variation gibt es verschiedene Erklärungen. Zum einen sind die implantierten Lungenwürfel primär dreidimensionale Würfel, die nach Implantation in die Kammer durch das Deckglas platt gedrückt werden und überwiegend in eine zweidimensionale Form gepresst werden. Zum anderen liegt in der Methode des Ausschneidens bereits eine Ungenauigkeit: Die Stücke wurden innerhalb der Petrischale standardisiert präpariert, wobei eine selbst hergestellte Schablone bestehend aus schwarzen Quadraten auf weißem Papier darunter lag. Das Präparieren an sich war technisch nicht ganz simpel. Ziel war, pleurafreie und aus dem peripheren Lungengewebe und daher idealerweise bronchienfreie Gewebestücke zu gewinnen. Die Lungenstücke wurden vorsichtig mit einer Pinzette fixiert, ohne dabei das Gewebe schädlich zu quetschen, und das Material geschnitten, das durch die Pinzette an einem Eckpunkt nur wenig fixiert und daher sehr mobil war. Es war dadurch nicht immer möglich, Würfel mit exakten Kanten herzustellen.

Wie unter 5.2.2 beschrieben hat sich die Organgröße über den Zeitraum von 14 Tagen nicht merklich verändert. Unklar ist, ob das implantierte Gewebe sich minimal ausbreitet, um mit den Gefäßen in das Kammergewebe zu sprossen, oder ob lediglich die einzelnen Gefäße aussprossen und die eigentliche Organgröße davon unberührt bleibt. Die gesamte Gefäßlänge der einzelnen ektopen Organe und die Gefäßdichte derer nehmen über denselben Zeitraum explosionsartig zu.

6.1.1.2 Revaskularisierte Fläche

Zunächst einmal lässt sich festhalten, dass sowohl Lungen- als auch Endometriumgewebe eindrucksvoll schnell in der Rückenhautkammer revaskularisieren, wie unter 5.2.3 beschrieben. Obwohl die ektopen Organstücke aus ihrem normalem Umfeld entnommen werden, und jegliche Blutzufuhr dadurch zunächst komplett unterbrochen wird, regenerieren sie bemerkenswert zügig und schließen sich an den Blutkreislauf der Rückenhautkammer der Empfängermaus an.

Das transplantierte Lungengewebe ist an Tag 3 erst zu 7% revaskularisiert, an Tag 6 bereits zu fast 60% und an Tag 10 dann schon zu 94%. An Tag 14 sind schließlich 99% des Lungengewebes revaskularisiert. Das Endometriumgewebe verhält sich et-

was schneller: An Tag 3 sind dort bereits beachtliche 72% der Organfläche revaskularisiert und an Tag schon 90%. An Tag 10 sind es bei diesem Gewebe schon 100%, das Organ ist also zu diesem Zeitpunkt bereits komplett revaskularisiert. Das Lungengewebe revaskularisiert später, die prozentuale Kurve ist jedoch wesentlich steiler als die des Endometriums, d.h. die Lungenkurve fängt viel tiefer an, steigt dann aber umso steiler. Die Revaskularisierung pro Zeiteinheit ist also viel größer. Das Lungengewebe braucht für den Revaskularisierungsprozess etwas mehr Zeit, andererseits entstehen vor allem beim Lungengewebe umso stärkere Blutflüsse. Die Frage ist, warum verhalten sich die beiden Organe so unterschiedlich, wie kommt es, dass Endometrium so viel schneller revaskularisiert. Die beiden Gewebearten sind von Natur aus sehr unterschiedlich. „Die Lunge erfüllt eine simple Funktion: Gasaustausch. Aber ihre Haushaltssysteme sind sehr komplex. Surfactant sezernierende Zellen bewahren Alveolen vor dem Kollabieren. Makrophagen durchkämmen fortwährend die Alveolen nach Dreck und Mikroorganismen. Die Schleim sezernierenden Becherzellen und die bewegenden Zilien schlagen Zelltrümmer aus den Luftwegen“ (Alberts et al., 2002).

Die Lunge ist funktional ein Blutschwamm, sie hat ein sehr ausgeprägtes Gefäßsystem. Sie hat die Aufgabe, alle im Blut fließenden Neutrophilen zu sequestrieren. Neutrophile leben 3-8 Stunden im Blut, folglich handelt es sich hier um einen ganz dynamischen Prozess. Des Weiteren hat Lunge die Aufgabe, Blut mit Luft abzugleichen, zu oxygenieren. Sie ist stets bestrebt, so viel Blut wie möglich zu exponieren, außerdem erwärmt sie das Blut. Endometrium dagegen ist eine Zellschicht, die primär nicht vaskularisiert ist. Warum das Endometrium schneller als die Lunge revaskularisiert, ist nicht geklärt, man kann jedoch festhalten, dass es Unterschiede diesbezüglich gibt. Es scheint einen gewaltigen Stimulus zu geben. Eventuell hat das Endometriumgewebe einen größeren Hypoxiestimulus als das Lungengewebe.

Besitzt das Endometriumgewebe eventuell stabilere Gefäße? Oder braucht es zur Versorgung von außen her weniger Blutzufluss und ist somit genügsamer, um seine Versorgung aufrecht zu erhalten? Oder aber hält es die Gefäße innerhalb des Gewebes während der Transplantation besser aufrecht und braucht dann nur noch Anschluss an das Kammergewebe?

6.1.1.3

Gefäßdurchmesser

Die Gefäßdurchmesser wurden ebenfalls wie auch alle anderen hämodynamischen Parameter an den verschiedenen Messtagen stets erneut gemessen und festgehalten. Wie unter 5.2.4 beschrieben bleiben die Durchmesser der Endometriumgefäße über die 14 Tage nahezu konstant. Die gemessenen Durchmesser der Lungengefäße sind zu jedem Messpunkt im Durchschnitt etwas größer als die der Endometriumgefäße.

Bei den Lungengefäßen fällt auf, dass die Durchmesser nicht konstant bleiben. In den ersten Tagen steigen die gemessenen Durchmesser und fallen im Anschluss daran sogar unter den Ausgangswert ab. Diese Beobachtung kann einerseits auf einem Messfehler beruhen, indem an den verschiedenen Messtagen zufällig jeweils 10 andere Gefäße gemessen wurden und dann an bestimmten Tagen der gemessene Durchschnitt ungleich groß war. Andererseits können aber auch Umbauprozesse hierfür verantwortlich sein. In der Kammer laufen multiple Prozesse wie Fibrose und Entzündung ab, die wiederum Mediatoren frei setzen, die wiederum eine Vasokonstriktion auslösen. Zum Ausschluss des Messfehlers wäre es ideal, immer die exakt gleichen 10 Gefäße an den verschiedenen Messtagen zu messen. Dies war allerdings praktisch nicht durchführbar, da sich das Gefäßbild innerhalb einiger Tage so sehr verändert, dass, trotz Aufzeichnung mithilfe von Fotografien und Einzeichnen der gemessenen Gefäßstellen auf den ausgedruckten Bildern, die gleichen Stellen oft nicht wieder erkannt werden können. Dies liegt an einem Umbau, der innerhalb der Kammer vonstatten geht. Es kommt unter anderem zu einem Gefäßumbau, zu einer Inflammation und Fibrosereaktion. Die Rückenhautkammer lässt sich demzufolge nur zeitlich begrenzt intravitalmikroskopieren. Auf der Rückenhaut lastet eine enorme mechanische Belastung, die präparierten Löcher für die Schrauben der Kammer reißen mit der Zeit aus. Das Gewebe verträgt diese Belastungen nur über einen Zeitraum von ca. 14-17 Tagen.

6.1.1.4 Flussgeschwindigkeit

Wie unter 5.2.5 beschrieben verhalten sich die beiden implantierten Organe hinsichtlich ihrer Flussgeschwindigkeit unterschiedlich. Während der Tage 3-6 nach Implantation steigen bei beiden verglichenen Organen die Flussgeschwindigkeiten fast identisch steil an. Ab Tag 6 bleibt die Flussgeschwindigkeit der Endometriumgefäße jedoch konstant. Die Flussgeschwindigkeit der Lungengefäße steigt währenddessen immer weiter stark an. Dies spricht dafür, dass die Lungenorgane sehr gut in das Empfängergewebe integriert werden und ihren physiologischen Eigenschaften sehr nahe kommen. Die Lunge ist dafür typisch, extrem schnelle Flussgeschwindigkeiten aufzubauen. Alle bisher untersuchten Organe in der Rückenhautkammer hatten wesentlich geringere Flussgeschwindigkeiten, das Organ Lunge ist in dieser Hinsicht einmalig.

6.1.1.5 Funktionelle Kapillardichte

Funktionelle Kapillardichte bedeutet die Gesamtlänge an durchbluteten Gefäßen pro gemessene Fläche. Wie unter 5.2.6 beschrieben, steigt die funktionelle Kapillardichte von beiden untersuchten Organen Lunge und Endometrium über die 14 Tage Untersuchungszeitraum an. Die Organe unterscheiden sich jedoch in der Art ihres Anstiegs.

Während das Endometrium schon an Tag 3 eine große Kapillardichte aufweist, die dann nur noch gering ansteigt, verhält sich das Lungengewebe da wesentlich langsamer: Hier steigt die Kapillardichte nur langsam, dafür jedoch stetig. Die beiden verglichenen Organe haben an Tag 14 sodann ähnlich große Kapillardichten. Die Gründe für dieses unterschiedliche Verhalten zu analysieren, ist nicht ganz einfach. Wie unter 6.1.1.2 erläutert, breitet sich die revaskularisierte Fläche des Endometriums viel eher aus als die des Lungengewebes. Wie auch in 6.1.1.2 überlegt, kann es eventuell sein, dass das transplantierte Endometrium besser in der Lage ist, seine Gefäßarchitektur aufrecht zu erhalten und dann nach der Implantation in die Rückenhautkammer schneller seine alte Funktionalität zurückerlangt. Es ist nahe liegend, dass die funktionelle Kapillardichte zusammen mit dem Parameter „revaskularisierte Fläche“ ansteigt. Es verwundert also nicht, dass die beiden Parameter eine sehr ähnliche Kurve aufweisen. Beide Kurven des Endometriums steigen in den ersten Tagen zunächst schnell an und bleiben dann nahezu konstant. Es existieren offensichtlich Unterschiede in der Gefäßversorgung zwischen Endometrium und Lunge. Die Lunge ist ein „Blutschwamm“, ein extrem gut vaskularisiertes Organ. Das Endometrium hingegen ist eine Epithelschicht, die primär nicht vaskularisiert ist. Sie muss sich neu organisieren für die Sauerstoffzufuhr. Während die Epithelzellverbände vaskularisieren, scheinen endogene Stimuli eine Angiogenese zu aktivieren. Oder sind die Gefäße des Endometriums gar einfacher zu regenerieren, als die der Lunge? Ist die Gefäßarchitektur komplizierter, aufwendiger zu regenerieren? Oder verhält sich Lunge als Organ langsamer im Gefäßaufbau?

6.1.1.6

Anzahl Leukozyten pro Länge Gefäß

Die beiden Organe Lunge und Endometrium unterscheiden sich ebenfalls in der Leukozyteninfiltration. Wie in 5.2.7 veranschaulicht kommt es beim Endometrium viel früher, nämlich bereits an Tag 3 nach Implantation zu einer Leukozyteninfiltration. Diese bleibt bis Tag 6 bestehen und ist dann bereits wieder stark regredient. Die Lunge verhält sich da anders: Erst an Tag 10 ist hier eine Infiltration der Leukozyten zu verzeichnen, die bis Tag 14 leicht regredient ist. Es ist nicht klar, warum die Leukozyten so viel eher das Endometrium als die Lunge infiltrieren. Es wäre denkbar, dass diese schnellere Infiltration der Leukozyten beim Endometrium mit der zu diesem Zeitpunkt (Tag 3) wesentlich höheren Kapillardichte des Endometriums im Gegensatz zu der des Lungengewebes zu tun hat. Dort, wo eine größere Gefäßdichte vorhanden ist, fließen auch mehr Zellen und eben auch Leukozyten. Dieser Faktor wurde jedoch mit eingerechnet. Die absolute Anzahl der Leukozyten wurde bei dieser Studie pro Gefäßlänge angegeben.

Eine mögliche Ursache ist der unterschiedliche Zeitpunkt der Entzündungen in den beiden Geweben. Die unterschiedlichen Zeitpunkte der Leukozyteninfiltration dieser beiden Gewebe hängen aber eventuell auch mit der Form der Angiogenese in den Gewebearten zusammen. Vermutlich sind verschiedene Botenstoffe/Stimuli für die Angiogenese verantwortlich. Es ist auch möglich, dass in den ektopen Gewebestücken andere Formen der Angiogenese existieren als in dem Originalorgan. Es können unterschiedliche Formen der Angiogenese unterschieden werden, die inflammatorische, die neurogene und die Tumorangio-genese: Die Tumorangio-genese ist bereits gut definiert worden (Seed & Walsh, 2008). Die Entwicklung, das Wachstum und die Progression von Tumorgewebe hängen von einer adäquaten Gefäßversorgung ab, die von den Wirtsgefäßen ausgeht. Dieser Prozess beinhaltet komplexe Interaktionen zwischen Tumorzellen und nicht neoplastischen Gefäßen, dem Immunsystem und dem Bindegewebe (Fontanini, 2000). Tumorangio-genese bezieht sich auf die Entwicklung von neuen Gefäßen innerhalb eines Tumors. Ein Ungleichgewicht zwischen angiogenen Wachstumsfaktoren und Inhibitoren, die durch die Tumorzellen, die Endothelialzellen und durch Entzündungszellen freigesetzt werden, ist nötig, um die Tumorneovaskularisation zu entwickeln (Fontanini, 2000). Hierzu wurden in den letzten 30 Jahren unzählige Studien veröffentlicht (Fontanini, 2000).

Einer der Regulatoren, der die Angiogenese kontrollieren kann, ist das Nervensystem (Mapp & Walsh, 2008). Neuropeptide sind bekannt dafür, dass sie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* angiogene Effekte haben (Mapp et al., 2008). Neuropeptide werden bei der akuten Entzündungsantwort freigesetzt, aber ihre Rolle bei chronischen Entzündungsprozessen ist wesentlich weniger gewiss (Mapp et al., 2008). Es scheint einen Abbau von Nerven in den Geweben zu geben, die chronisch entzündet sind (Mapp et al., 2008). Dies mag damit zu tun haben, dass Nerven nicht mit der gleichen Teilungsrates wachsen können wie proliferierendes Gewebe oder mit dem direkten toxischen Effekt von einem oder mehreren Komponenten des Entzündungsmilieus (Mapp et al., 2008). Unter solchen Konditionen wird postuliert, dass andere Peptide die angiogenen Rollen von neuronal abgeleiteten Peptiden übernehmen, wobei sie dazu manchmal die gleichen Rezeptoren auf den endothelialen Zellen benutzen (Mapp et al., 2008).

Dendritische Zellen sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen mit einer einmaligen Fähigkeit, eine T- und B-Zell-Antwort oder eine Immuntoleranz zu induzieren (Riboldi, Sozzani, & Presta, 2008). Dendritische Zellen befinden sich in peripheren Geweben in einem unreifen Stadium, wo sie eine Wachfunktion für eingehende Antigene haben. Nach mikrobiellem Kontakt und Stimulation durch inflammatorische Zytokine nehmen dendritische Zellen Antigene auf, durchleben einen Reifungsprozess und

gelangen über die hinführenden Lymphgefäße in den T-Zell-Bereich des sich entleerenden Lymphknotens, um die Immunantworten zu initiieren (Riboldi et al., 2008).

6.1.1.7 Apoptose

Wie in 5.2.8 angegeben hat von den drei verglichenen Geweben Lunge, Endometrium und Kammergewebe das Endometrium die höchste Apoptoserate. Dies spricht dafür, dass hier die meisten Zellen sterben. In der Lunge ist diese Rate im Vergleich zum Kammergewebe sehr niedrig. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Tatsache, dass Endometrium aus einer dünnen Epithelzellschicht mit Drüsen und einem mit zahlreichen Gefäßen bestückten Stroma zwischen den Drüsen besteht, und diese Zellen sehr kurzlebig sind, während die Lungenzellen anderen Zyklen der Regeneration unterworfen sind. Die Anzahl untersuchter Mäuse war hier jedoch nur eine, was sicher nicht aussagekräftig und repräsentativ genug ist.

6.1.2 Vergleich mit Endometrium

Wir benutzten in unseren Studien Endometrium als Vergleichsorgan zur Lunge. Dies bot sich unter anderem an, da der Uterus eines der wenigen Organe ist, das entfernt werden kann, ohne dabei die Lebensqualität des Versuchstieres stark einzuschränken. Des Weiteren war Endometrium in der Rückenhautkammer ein vorher bereits etablierter Versuchsaufbau, was die Entscheidung zu diesem Vergleichsorgan weiter beeinflusst hat. Die Endometriumentnahme an sich, war eine komplexe eigenständige Operation, die zunächst erlernt werden musste. Dies führte dazu, dass in der Lernphase zunächst einige Mäuse starben. Eine natürliche Einschränkung war, dass hierzu lediglich weibliche Versuchstiere genommen werden konnten. Den Mäusen wurde - wie unter 4.5.1 beschrieben - das eigene Endometriumgewebe in die Rückenhautkammer implantiert. Daraus ergab sich, dass nach der Narkosezeit für die Endometriumentnahme die Narkosezeit für die Präparation des Endometriums und der Rückenhautkammer folgte, so dass die Tiere verlängert in Narkose waren, im Gegensatz zu den Tieren, die lediglich Lungenstücke von Spendertieren in die Rückenhautkammer implantiert bekamen. Ein Vorteil der Organwahl war, dass das Endometrium hervorragend anwächst. In kürzester Zeit entstehen glomerulumartig strukturierte Gefäßknäuel. Bei den Mäusen der vorliegenden Studie konnten keine postoperativen Schäden, Entzündungen oder andere negative Folgen festgestellt werden. Allerdings sind innerhalb der ersten drei Tage nach Implantation des Endometriums einige Tiere - vermutlich an den Folgen der Operation - verstorben. Die Versuchstiere, die den Tag 3 nach Implantation überlebten, überlebten alle bis an Tag 14 nach Implantation und konnten für sämtliche Messungen verwendet werden. Ein großer Einflussfaktor war sicherlich die

fehlende Routine bei der Endometriumentnahme verglichen mit der Lungengewebegewinnung, da in den vorliegenden Studien wesentlich mehr Rückenhautkammern der Versuchsmäuse mit Lungengewebe versorgt wurden. Insgesamt waren wir dennoch mit der Entscheidung zu diesem Vergleichsorgan sehr zufrieden, da es nur wenige Probleme während der Versuche auslöste und es zu besonders ausgebildeten Angiostrukturen innerhalb der implantierten Gewebestücke kam.

Das gewählte Vergleichsorgan verhielt sich in vielen Parametern sehr gegensätzlich zu dem ebenfalls implantierten Lungengewebe (siehe auch 6.1.1). Die Vaskularisierung verlief sehr unterschiedlich. So waren die Geschwindigkeit der Revaskularisierung (siehe 6.1.1.2), das Verhalten der Gefäßdurchmesser (siehe 6.1.1.3), die Flussgeschwindigkeit (siehe 6.1.1.4), die funktionelle Kapillardichte (siehe 6.1.1.5), die Leukozyteninfiltration (siehe 6.1.1.6) und die Apoptoserate (siehe 6.1.1.7) in beiden verglichenen Organen sehr unterschiedlich. Das liegt vermutlich an den komplett verschiedenen Herkunft, Funktionalitäten und Aufgabenbereichen der beiden Organe. Während Endometrium eine dünne Epithelzellschicht mit Drüsen und Stroma ist, die den Uterus auskleidet und zyklischen Veränderungen unterworfen ist, ist die Lunge ein Blutschwamm, der ein hohes Minutenvolumen hat und primär enorm vaskularisiert ist. Bei den Hypoxie-Hyperoxie-Serien verhielten sich Endometrium und Lunge absolut gegensätzlich. Die Gefäße des Endometriumgewebes reagierten wie auch die Kammergefäße auf eine Hypoxie mit einer Vasodilatation und mit einer Vasokonstriktion auf eine Hyperoxie.

6.1.3 Vergleich unseres Versuchsaufbaus mit dem “Animal Model” von Sriramarao et al.

6.1.3.1 Versuchsaufbau und äußere Bedingungen

Es existiert eine Forschungsgruppe, die einen sehr ähnlichen Versuchsaufbau hatte. Die Forschungsgruppe von P. Sriramarao aus San Diego veröffentlichte 2003 im American Journal of Pathology dieses Modell. Sie fanden heraus, dass das Lungenallograft in der Rückenhautkammer auf verschiedene externe Stimuli wie Zytokine und vasoaktive Mediatoren reagierte. Des Weiteren könne mit diesem Modell die Interaktion zwischen Leukozyten und Gefäßendothel in der Lungenmikrozirkulation sowohl unter akuten als auch unter chronischen experimentellen Konditionen evaluiert werden.

Wir haben genauso wie diese Forschungsgruppe Lungengewebe in die Rückenhautkammer von Mäusen transplantiert. Sie benutzten dazu ausschließlich Nacktmäuse, wobei wir die Charakterisierungsversuche, die Hypoxie-Hyperoxie-Serien und die Ischämieversuche an C57BL/6-Mäusen durchführten und lediglich für die Versuchsrei-

he mit der Gabe von endothelialen Progenitorzellen Nacktmäuse verwendeten. Bereits die Amerikaner stellten fest, dass die Lungenstücke revaskularisieren, und es zu einem Blutfluss kommt. Im Gegensatz zu uns stimulierten sie mit TNF- α , und sowohl die Arteriolen als auch die postkapillaren Venolen der Mikrozirkulation der Mäuselungenstücke reagierten mit Leukozyten-Rolling und -Adhäsion. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der Systemzirkulation der Maus, wo Leukozyten-Rolling vor allem in den postkapillären Venolen und nur sehr selten in Arteriolen beobachtet wird.

In entzündeten Lungenmikrogefäßen scheinen P-Selectin und L-Selectin die wichtigsten Rolling Rezeptoren zu sein, so Sikora et al. Sie beobachteten weiterhin, wie die Leukozyten ihre Form bei der Passage durch die Lungenkapillaren verändern und als deformierte Leukozyten in den postkapillaren Venolen weiterrollen. Für die Versuche haben Sikora et al. Nacktmäuse im Alter von 8-10 Wochen mit einem Körpergewicht von 25-30 Gramm verwendet. Unsere Versuchstiere waren zwischen 8-20 Wochen alt und hatten ein Körpergewicht von 20-35g, ähnlich wie bei der Gruppe aus San Diego (8-10 Wochen alte Nacktmäuse, 25-30 Gramm Körpergewicht). Unsere Mäuse wurden anästhesiert mit 0.1ml/10g Körpergewicht „Rompun/Ketanest“-Gemisch (0.75ml „Keta-vet“ (Ketamin) und 1,0ml „Rompun“ (Xylazin) auf 10ml NaCl 0.9% aufgezogen) intraperitoneal, während die Mäuse von Sikora et al. mit einem Cocktail bestehend aus Kochsalzlösung, Ketamin Hydrochlorid und Xylazin (7.5 und 2.5mg pro 100mg Körpergewicht) narkotisiert wurden. Dieser Unterschied hinsichtlich der Narkose wird kaum denkbar merkbare Unterschiede in den Versuchen oder der Narkosetiefe verursachen. Wie deren Studiengruppe haben auch wir unsere Mäuse auf ein Heizkissen gelegt, so dass die Tiere unter der Narkose nicht auskühlten. Mit einem Bratenthermometer (aus dem Haushaltswarenladen), das direkten Hautkontakt mit der Maus hatte, und zwischen einem Abdecktuch, das auf dem Heizkissen lag und der Maus war, wurde die Temperatur regelmäßig überprüft.



Abbildung 107: Bratenthermometer zur Überwachung der Körpertemperatur des Versuchstieres

Hierbei entstehen wahrscheinlich Messungenauigkeiten, da das Thermometer von allen Seiten misst. Die Unterseite misst direkt an dem Heizkissen, dass wiederum die Wärme an das Tier abgibt. Die gemessene Temperatur wird jedoch einen annähernden, brauchbaren Richtwert wiedergeben.

Der Kammerbau an sich war bei beiden Studiengruppen identisch. Beide Male wurden Titaniumrahmen verwendet, die zur Hälfte auf die Rückenfalte implantiert wurden, wobei - wie unter 4.2.2 beschrieben - auf einer Seite eine runde Schicht von 12mm (bei Sikora et al. 15mm Durchmesser) Durchmesser mit Hautmuskel (*M. cutaneus max.*), subkutanem Gewebe und die Epidermis entfernt wurden. Anschließend wurde die Stelle mit einem runden, in der Größe identischen Plexiglas abgedeckt. Bei deren Versuchen wie auch bei unseren hatten die Tiere 2-3 Tage Zeit, sich von dem Eingriff zu erholen. Erst danach wurde das Plexiglas kurzzeitig entfernt, um die Lungenstücke, wie unter 4.4.1 erklärt, zu implantieren. Als Spender wurden bei Sikora et al. neonatale BALB/c-Mäuse in einem Alter von 5-24 Stunden benutzt. Wir benutzten als Spender C57BL/6-Mäuse in einem Alter von 8-20 Wochen. In San Diego wurde die Transplantation des Lungenallograftes unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Solche guten Bedingungen konnten wir in unserem Labor in Homburg leider nicht erfüllen. Die Transplantation wurde bei uns unter nichtsterilen Bedingungen durchgeführt. Das Instrumentarium war steril, die Unterlage unsteril, so auch die Handschuhe. Lediglich die Petrischalen, in denen die gewonnenen Lungenstücke zur Aufbewahrung und Färbung mit dem Leuchtstoff kamen, waren steril. Ein weiterer Unterschied der beiden Versuchsgruppen ist: Die Gruppe von Sikora et al. schnitt longitudinale Lungenscheiben in der Peripherie der Lunge, während wir aus der Peripherie kleine Lungenwürfel mit einer Kantenlänge von 0.5mm präparierten. Vermutlich hat für die Revaskularisation und das Anwachsen der Organstücke die Form keine weitere Bedeutung. Das Wichtige hierbei ist, dass die Gefäße der Organe und die Kammergefäße miteinander verwachsen. Die Lungenstücke wurden dann in San Diego in steriler Hank's Pufferlösung mit 5(6)-(((4-Chlormethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamin (CMTMR) mit einer Konzentration von 1mg/ml für 30 min gelagert, um das Lungenallograft mit Fluoreszenzen zu labeln. Das mit Fluoreszenzen markierte Lungenallograft wurde mit Hank's Puffer kurz abgespült und dann implantiert. Wir verwendeten als Lösung in der Petrischale DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) + FCS 10%. In eine der beiden damit gefüllten Petrischalen gaben wir zusätzlich 3 Tropfen Bisbenzimid zum Markieren der Organe. Das so markierte Lungestück war sowohl bei den Amerikanern als auch bei uns für 2-3 Tage fluoreszierend. Auf diese Weise konnte es sehr gut im Intravitalmikroskop dargestellt und in der Rückenhautkammer schnell wieder gefunden werden. Die Empfängermaus wurde in beiden Gruppen anästhesiert wie oben beschrieben, und

dann wurden bei den Amerikanern 1-3 Lungenstücke, bei uns jeweils 3 Lungenstücke, oder aber 2 Lungen- und 2 Endometriumstücke in die Rückenhautkammer implantiert. Dabei wählten wir den größtmöglichen Abstand zwischen den Organstücken, so dass die gegenseitige Beeinflussung der Transplantate möglichst gering war. In den meisten Fällen sahen wir kein Zusammen- oder Ineinanderwachsen. Wir gehen davon aus, dass die Organe sich gegenseitig nicht beeinflusst haben. Jedes der Organe für sich ist sehr gut angewachsen. Nachdem Organe in die Rückenhautkammer implantiert worden waren, wurden diese bei der amerikanischen Studiengruppe wie auch bei uns mit Kochsalzlösung gespült. Wie unter 4.4.1 erklärt bestand die Schwierigkeit dabei darin, genug Flüssigkeit zu nehmen, um Lufteinschlüsse unter dem Deckglas zu vermeiden, und aber auch nicht zuviel Flüssigkeit zu verwenden, um die Lungenstücke nicht an den Rand der Kammer „schwimmen“ zu lassen. Auch bei dem Deckglas arbeitete die Gruppe von Sikora et al. sauberer: Sie benutzten sterile Silikonplättchen, während wir unsterile Einweg-Plastikdeckgläschen verwandten. Bei unseren Versuchen konnten wir jedoch keine Nachteile dadurch feststellen. In beiden Fällen wurde das Glas mit einem C-Ring in seiner Position gehalten.

6.1.3.2 Intravitalmikroskopie

Die Beobachtung mit dem Intravitalmikroskop erfolgte unter leicht differenten Bedingungen. In Homburg setzten wir eine Plexiglasbühne ein, auf die das Versuchstier auf einigen Kompressen als Unterlage in narkotisiertem Zustand gelegt wurde. Mit dieser Hilfe war die Rückenhautkammer in absolut waagerechter Position, konnte so fixiert und das Tier mitsamt der Bühne gut mobilisiert werden, was wichtig ist für die Beobachtung unter dem Mikroskop bzw. Intravitalmikroskop. Sikora et al. benutzten aus dem gleichen Grund eine Plexiglasröhre, die auf der einen Seite geschlossen ist und auf der anderen einen Schlitz hat, durch den die Rückenhautkammer nach außen gelangt. Die Röhre enthält mehrere größere Löcher, so dass das Tier Sauerstoff bekommt. Nach Fixierung wird diese Röhre wie die Bühne dafür benutzt, das Versuchstier bzw. die Kammer zu fixieren und das gesamte Tier möglichst leicht hin und her bewegen zu können. An Tag 0 (Tag der Implantation) machten beide Studiengruppen zunächst ein Übersichtsbild von den einzelnen Organstücken. Diese wurden jeweils mit einer VHS-Kassette aufgenommen. Beide hatten wir ein Intravitalmikroskop, mit dem wir an verschiedenen Tagen die Gefäßflüsse und Angiostrukturen festhalten konnten. Um die Gefäße intravitalmikroskopisch darstellen zu können, verwendeten beide FITC-Dextran (5%, 0.1ML; MG 150000; SIGMA), das i.v. appliziert wurde. Dadurch erhält man Gefäßkontrast und Plasmaverstärkung. Das System des Sichtbarmachen war bei beiden Malen das Gleiche: Mit einer Kamera, die an dem Mikroskop an-

gebracht und mit einem Bildschirm verbunden ist, wird das Bild dargestellt und mithilfe eines VHS-Videorecorders aufgezeichnet, um die Bänder dann später offline auswerten zu können. In beiden Fällen wurden diese Beobachtungen regelmäßig über einen Zeitraum von 2 Wochen durchgeführt.

6.1.3.3 Markierung der Erythrozyten

Die Gruppe Sikora et al. hat zusätzlich Erythrozyten markiert, um die mikrohämodynamischen Parameter zu messen. Dieses Verfahren haben wir dagegen nicht benutzt. Zum Markieren wurde FITC-Dextran (5%, 0.1ml; MG 150000; SIGMA) verwandt. Frisch entnommenes heparinisiertes Blut von 5-6 erwachsenen Mäusen wurde 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und die entstehende gelbbraune obere Schicht entfernt. Die bei diesem Prozess gewonnenen Erythrozyten wurden mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, um die endgültige Leukozytenkontamination auf unter 0.1% zu reduzieren. Die Erythrozyten/FITC-Lösung wurden für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln mit behutsamem Schütteln inkubiert. Die mit FITC-Dextran markierten Erythrozyten wurden nachfolgend mit PBS 3 Male gespült. Anschließend wurden die markierten Erythrozyten (2.5×10^6) in die Schwanzvene einer Nacktmaus mit komplett revaskularisierten Lungenallograften (nach Tag 9) injiziert. Die Zirkulation der injizierten Erythrozyten wurde mit stroboskopischer Epi-Illumination sichtbar gemacht und die Bilder mit einem VHS-Videokassettenrecorder aufgenommen, um sie später offline auswerten zu können. Zusätzlich zu der Auswertung von Gefäßdurchmessern konnten so Scherungsraten bestimmt werden. Dieses scheint eine sehr gute, wenn auch aufwendige Methode zu sein. Durch die Erythrozyten lassen sich dadurch Informationen über Fluss und Aufteilung gewinnen.

6.1.3.4 Benetzung der Lungentransplantate mit ET-1

Endothelin-1 (ET-1) ist ein vasokonstriktorisches Peptid der Gefäßwände, bestehend aus 21 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 2492D. Endothelin-1 wird in den Endothelzellen der Blutgefäße gebildet. Es funktioniert in unterschiedlichen Geweben und Organen als starker Vasokonstriktor und führt zudem zu einer Proliferation der glatten Muskelzellen. Die Wirkung wird in der glatten Muskulatur durch ETA- und ETB-Rezeptoren (vasokonstriktiver und mitogener Effekt) und in den Endothelzellen durch ETB-Rezeptoren (NO-Bildung und Prostacyclin-Freisetzung) vermittelt (Donovan & Gearhart, 2001b). Endothelin spielt eine wesentliche pathogenetische Rolle bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen mit Endothel-Dysfunktion. Es ist bei Gewebe- und Organschädigungen an einem Gefäß-Remodelling beteiligt (Abraham &

Dashwood, 2008). Eine Hemmung der Endothelin-Rezeptoren kann therapeutisch zum Beispiel bei der pulmonalen Hypertonie eingesetzt werden (Opitz & Ewert, 2006).

Die Forschungsgruppe Sikora et al. untersuchte im Gegensatz zu uns den Effekt von Endothelin-1 (ET-1) auf die Vasokonstriktion der Lungenmikrogefäße. Bei 22 Mäusen wurde dazu zunächst FITC-Dextran appliziert, um eine komplette Revaskularisation und Entwicklung des Blutflusses in den ektopen Lungenstücken mit dem Intravitalmikroskop sicherstellen zu können. Nach dieser Bestätigung wurde das Deckglas vorsichtig entfernt und die Lungenstücke mit 50µl ET-1 beträufelt, die Kontrollgruppe dagegen lediglich mit Pufferlösung. Eine Minute nach der Applikation wurden beide Lösungen mit Kochsalzlösung ausgetauscht und das Deckglas ersetzt. Jede Maus wurde unmittelbar danach mit der Mikroskopierbühne verlegt und der Effekt der ET-1-Applikation auf die Vasokonstriktion der Lungengefäße über einen Zeitraum von 60 Minuten bestimmt. Die Ergebnisse wurden über den gesamten Zeitraum des Versuches mit dem Videorecorder festgehalten. Die hierbei festgestellte Möglichkeit von ET-1, eine Vasokonstriktion bei revaskularisiertem Lungengewebe hervorzurufen, gab eine Antwort auf die Frage, ob das Lungenallograft auf externe Stimuli reagierte. Die komplette Benetzung mit ET-1 mit einer Konzentration von 1.0µmol/L verursachte eine sofortige Vasokonstriktion der Lungengefäße an multiplen Orten. Die Konzentration von 1 µmol/L erwies sich als optimal, und eine Konzentrationssteigerung auf 10 µmol/L führte zu keiner weiteren Zunahme der Vasokonstriktion. Die Benetzung mit ET-1 resultierte in einer signifikanten Vasokonstriktion der Blutgefäße von $66.7 \pm 11.5\%$ des Ausgangsdurchmessers. Es war eine generelle Konstriktion aller Blutgefäße zu verzeichnen, obwohl das Ausmaß der Konstriktion in den verschiedenen Regionen der Blutgefäße stark variierte. Die genannten Werte beziehen sich auf die Regionen, wo die stärkste Vasokonstriktion festzustellen war. Im Gegensatz dazu hatte die Benetzung mit Pufferlösung keinen Effekt. Der Effekt von ET-1 bestand für 45 Minuten, und anschließend waren die meisten der konstringierten Gefäße wieder auf ihren ursprünglichen Durchmesser dilatiert.

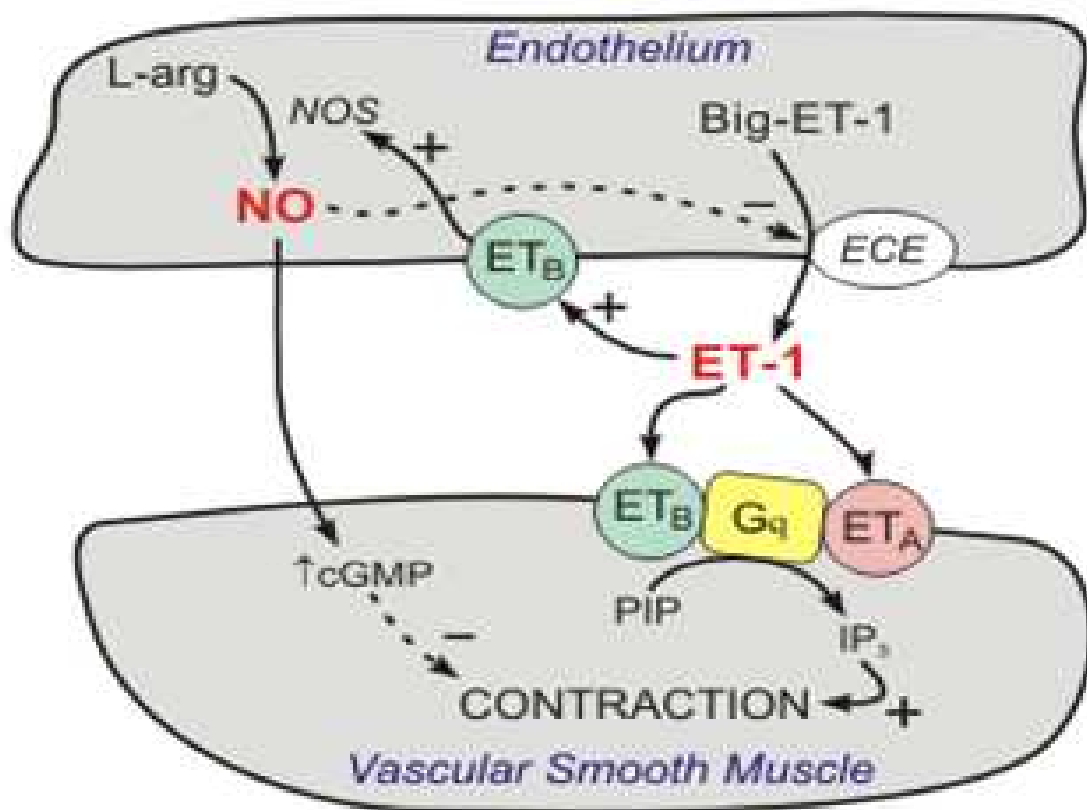


Abbildung 108: Endothelin-1 führt zu einer Vasokonstriktion der Blutgefäße (Klabunde, 2010).

6.1.3.5 Effekt von TNF- α

Tumornekrosefaktor (TNF- α) ist ein multifunktionaler Signalstoff (Zytokin) des Immunsystems bestehend aus 233 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 26kD, der bei lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt ist. TNF wird hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von Lymphozyten, Mastzellen, Endothelzellen, Herzmuskelzellen, Fibroblasten und neuronalem Gewebe gebildet. Seine wichtigste Funktion ist, die Aktivität verschiedener Immunzellen zu regeln. Es kann Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Ausschüttung anderer Zytokine anregen. TNF löst Fieber aus und ist an der Entstehung der Kachexie bei bestimmten Krankheiten beteiligt. Ferner hat es Effekte auf den Fettstoffwechsel, die Koagulation, die Insulinresistenz und die endotheliale Funktion (Hehlhans & Pfeffer, 2005).

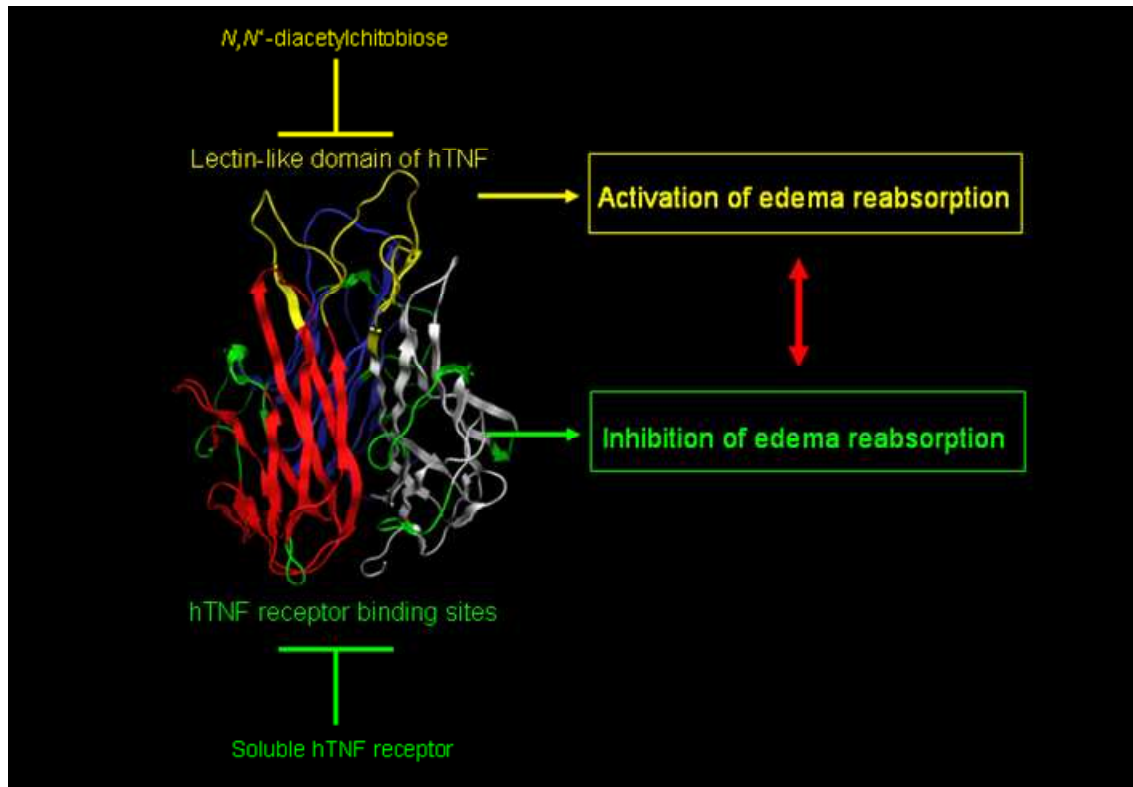


Abbildung 109: Struktur von TNF- α (Schultz & Letunic, 2010)

Die Gruppe in San Diego untersuchte den Effekt von TNF- α auf die Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und Endothel in den Lungenallograftmikrogefäßen. Wie bei dem Versuch mit Endothelin-1 wurden Mäuse verwendet, bei denen die Lungenstücke bereits gut angewachsen und revaskularisiert waren. An Tag 9-14 wurde das Deckglas entfernt und das Lungenstück mit 50 μ l TNF- α oder PBS als Kontrolle getränkt. Die Fähigkeit von TNF- α , Rolling oder Adhäsion von zirkulierenden Leukozyten, die *in vivo* mit Acridine-Orange (i.v. Injektion mit 2mg/kg Körpergewicht) gelabelt wurden, zu induzieren, wurde 4-6 Stunden nach Zytokinstimulation festgestellt. Die Interaktion der markierten Leukozyten wurde wie gehabt offline ausgewertet. Ohne Zytokinstimulation waren es nur sehr wenige Leukozyten, die rollten oder sich an die Gefäßwand anhefteten. Die Geschwindigkeit von rollenden Leukozyten in nichtentzündeten Arteriolen war erheblich höher ($36.7 \pm 33.2 \mu\text{m/sec}$) als in den Venolen ($16.5 \pm 3.8 \mu\text{m/sec}$). TNF- α -Stimulation des Lungenstücks resultierte in einem signifikantem Anstieg des Leukozyten-Rolling und -Anhaften an die Gefäßwand in den Venolen im Lungenallograft, verglichen mit dem Kontrollverdünnungsmittel (18.3 ± 2.9 vs. 6.2 ± 3.9 Rollers/Minute, $P < 0.05$; 5.9 ± 2.1 vs. 1.2 ± 0.5 adhärenente Leukozyten/250 μm Länge Blutgefäß, $P < 0.01$). TNF- α induzierte ebenso einen signifikanten Anstieg in Rolling und Adhäsion in Arteriolen verglichen mit der Kontrolle (17.7 ± 6.7 vs. 2.6 ± 1.1 Rollers/Minute, $P < 0.01$; 3.2 ± 0.6 vs. 0.6 ± 0.2 adhärenenter Leukozyten/250 μm Länge Blutgefäß, $P < 0.05$). Die Geschwindigkeit von Rollers in TNF- α -stimulierten Arteriolen ($25.5 \pm 20.7 \mu\text{m/sec}$) war größer als

die Geschwindigkeit von Rollers in Venolen ($9.5 \pm 5.5 \mu\text{m}/\text{sec}$). Ohne den chemotaktischen Faktor gelang es den adhärenenten Leukozyten nicht, die TNF- α -stimulierten Lungemikrogefäße zu passieren.

Mit dieser Methode kamen sie zu den gleichen Ergebnissen wie wir mit der Leukozytenmarkierung durch Rhodamin. An den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation färbten wir die Leukozyten an und stellten eine Infiltration der Lungestücke mit Leukozyten an den Tagen 6-10 fest. Wie auch die Amerikaner definierten wir Rollers als Leukozyten, die wesentlich langsamer als der Hauptblutfluss sind und sichtbar mit dem Gefäßendothel interagierten. Sie wurden bei beiden Studiengruppen per Hand gezählt, als Anzahl der durch einen bestimmten Referenzpunkt passierenden Leukozyten pro Zeiteinheit. Die Gruppe Sikora et al. bestimmte zusätzlich noch den Anteil dieser Leukozyten an der Gesamtzahl der Zellen, die pro Zeiteinheit diese Stelle passierte. Die so genannten Sticker oder adhärenenten Zellen wurden bei ihnen als solche definiert, die mindestens für eine Minute an Ort und Stelle blieben, und wurden als Anzahl adhärenenter Zellen pro $250 \mu\text{m}$ langen Gefäßabschnitt gezählt. Wir gingen ähnlich vor und bestimmten die Anzahl Leukozyten, die während 20 Sekunden im betrachteten Gefäßabschnitt hängen blieben, und maßen im gleichen Bildabschnitt die funktionelle Kapillardichte, so dass wir dann die Anzahl der Leukozyten pro Kapillardichte angeben konnten. Auf diese Weise stellten wir sicher, dass sich Verzerrungen im Ergebnis der Anzahl der Leukozyten durch verschieden stark durchblutete Areale vermeiden ließen. In diesem Punkt unterscheiden sich die Messmethoden voneinander. Während wir zusätzlich die durchblutete Kapillardichte mitberücksichtigten, also die Länge an Gefäßen, in denen wir die Leukozyten auszählten, maßen die Amerikaner etwas genauer, in dem sie sogar die Anzahl der insgesamt fließenden Zellen zählten und statt der Kapillardichte eine genau definierte Länge an Gefäßstrecke überhaupt nur auszählten. Das Auszählen größerer Flächen, wie wir es taten, ist jedoch in dem Punkt repräsentativer, als dass so ein Mittelwert für die Anzahl Leukozyten pro Gefäßabschnitte gebildet wird. Dieser Wert liegt dem realen Wert etwas näher, als wenn nur ein kurzes Stück Gefäßlänge ausgezählt wird. Die Amerikaner machten einen weiteren zusätzlichen Versuch und untersuchten den Effekt von monoklonalem Antikörper (mAb) gegenüber E-Selectin, L-Selectin, P-Selectin und $\alpha 4$ auf das Leukozyten-Rolling und die Leukozytenadhäsion. 4-6 Stunden nach TNF- α -Stimulation wurden $60 \mu\text{g}$ mAb i.v. appliziert und direkt anschließend mikroskopiert. Des Weiteren untersuchten diese Forscher offline den Effekt, den die Migration durch die Gefäße auf die Form der Leukozyten hat. Sich gegenseitig beeinflussende Leukozyten in den Kapillaren wurden als Prozent aller Zellen, die durch das Gefäß fließen, ausgedrückt.

Da TNF- α signifikant das Leukozyten Rolling und die Leukozytenadhäsion in den Lungenmikrogefäßen induzierte, untersuchten Sikora et al., ob die adhäsiven Interaktionen in den Lungenmikrogefäßen abhängig von der Verbindung von einem oder mehr Leukozyten (L-Selectin und $\alpha 4$ Integrine) und endothelialen Rolling Rezeptoren (inklusive E- und P-Selectine) sind. Antikörper-Blockade-Studien zeigten, dass die Behandlung von Mäusen mit Antikörpern, die gegen Leukozyten-exprimiertem L-Selectin gerichtet waren, signifikant das Leukozyten-Rolling in postkapillaren Venolen gehemmt hat (ungefähr 40% vs. Kontrolle). Ebenso inhibierte mAb gegen P-Selectin signifikant das Leukozyten Rolling in den Venolen (ungefähr 54% vs. Kontrolle), während die Behandlung mit anti-E-Selectin mAbs allein das Leukozyten Rolling nicht signifikant beeinflusst hat (ungefähr 9% vs. Kontrolle). Jedoch hat die Kombinationsbehandlung mit anti-E-Selectin und anti-P-Selectin mAb das Leukozyten Rolling fast komplett inhibieren können (ungefähr 97% vs. Kontrolle), was darauf schließen lässt, dass E-Selectin erheblich zum Leukozyten Rolling in Kombination mit P-Selectin beisteuert, möglicherweise verstärkt es das durch P-Selectin initiierte Leukozyten Rolling in den Lungenmikrogefäßen. In einer begrenzten Anzahl von untersuchten Arteriolen resultierte eine kombinierte Therapie mit anti-P- und E-Selectin in einer signifikanten Reduktion des Rolling, aber anti-E-Selectin allein schaffte es nicht, die Zahl der rollenden Zellen zu erhöhen.

6.1.3.6

Anästhesie

Es gibt einen weiteren Unterschied, was die Narkose angeht. Sikora et al. beschreiben in ihrem „Animal model“, dass sie lediglich für den Kammerbau und die Lungentransplantation die Maus in Narkose versetzten. Alle weiteren Beobachtungen der Lungestücke erfolgten dann ohne Narkose. Wir setzten die Versuchstiere bei jedem Eingriff und auch bei der Beobachtung der Lungestücke alle 3-4 Tage in Narkose. Nur so war gewährleistet, dass die Tiere unbewegt auf der Plexiglasbühne liegen blieben, und man statische Bilder der Organe aufzeichnen konnte. Im Paper ist leider nicht erklärt, mit welcher Methode sie die Tiere bei der Intravitalmikroskopie fixierten, so dass sie ebenfalls ein unbewegtes Bild erhielten. Für die Tiere ist es sicherlich von Vorteil, wenn sie möglichst wenige Anästhetika bekommen, um sie nicht unnötig zu belasten. Sobald die Tiere bei meinen Intravitalmikroskopie-Versuchen aus der Narkose erwachten, fingen sie an, wild zu zappeln und lösten sich fast aus der Fixierung, auch die fixierte Rückenhautkammer war in solchen Momenten in Bewegung. Es wäre sehr interessant zu wissen, wie die Amerikaner dieses Problem lösten.

6.1.3.7

Anwachsen der Lungenstücke

Sikora et al. beschreiben die Lungenstücke am Implantationstag wie folgt: Ein glatt begrenztes Gewebestück, bestehend aus einem Büschel von zerbrochenen Zellen. Zu diesem Zeitpunkt seien keine vaskulären Netzwerke sichtbar, abgesehen von vereinzelten Regionen mit Röte. Diesen Eindruck gewannen wir ebenfalls: An Tag 0 wirkte das umliegende Kammergewebe ungestört, der Blutfluss schien wie gehabt weiterzulaufen, und das transplantierte Lungengewebe war völlig ruhig, frei von Blutfluss und Bewegungen.

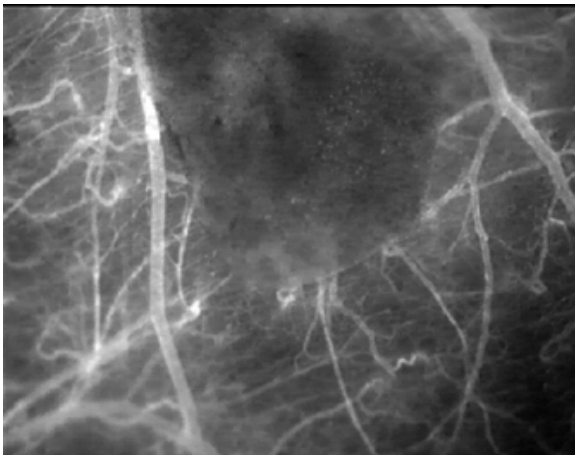


Abbildung 110: Frisch implantiertes ektopes Lungenstück in der Rückenhautkammer: Die Ränder sind relativ glatt begrenzt und es ist noch kein Blutfluss vorhanden.

Mit FITC-Dextran konnte die Fähigkeit der transplantierten Lungenstücke, Blutfluss zu entwickeln, demonstriert werden. Über einen Zeitraum von 10 Tagen konnten kontinuierliche und fortschreitende Veränderungen in der Bildung des Blutflusses erfasst werden. In den Tagen 1-3 nach Implantation gelangte FITC-Dextran nicht in die Lungengewebe, war aber jedoch deutlich in den umgebenden Kammergefäßen sichtbar, was einen normalen Blutfluss darstellte. In den Tagen 4-6 nach Implantation zeigte das Lungenstück jeweils einen zunehmenden Blutfluss. Zu diesem Zeitpunkt war bereits mehr als die Hälfte des Lungengewebes revaskularisiert. An Tag 9 offenbarte die Applikation von FITC-Dextran, dass sämtliche Gefäße der Lungenstücke revaskularisiert waren und ein Blutfluss ohne sichtbare Anzeichen einer Thrombose entstanden war. Zu diesen Ergebnissen kamen sowohl wir als auch die Studiengruppe in San Diego. Dies ist nicht sonderlich verwunderlich, da wir beide sehr ähnliche Rahmenbedingungen hatten und die Lungenstücke auf gleiche Weise implantierten. Auch bei unseren einzelnen Versuchstieren konnten wir ein sich immer wiederholendes gleiches Muster vom Anwachsen der Organstücke beobachten. Die implantierten Organstücke sahen sich jeweils sehr ähnlich, wuchsen am gleichen Tag an und zeigten auch sonst ähnliche Reaktionen.

Nach der Richtung des Blutflusses zu urteilen, konnte beim revaskularisiertem Lungengewebe zwischen Arteriolen, Kapillaren und Venolen unterschieden werden. Dies behaupten die Amerikaner in ihrem „Animal Model“. Wir konnten in unseren Lungenstücken auch verschiedene Flussrichtungen ausmachen. An einigen Stellen jedoch konnten wir Flussumkehrungen vermerken, so dass es teilweise nicht einfach war, eindeutig zwischen Arteriolen und Venolen zu unterscheiden. Bei den ersten Auswertungen am Cap Image (CapImage ist ein Computer-Programm für die Bildanalyse in der Mikrozirkulationsforschung, Zeintl, Heidelberg) unterteilten wir die Messungen nach Arteriolen, Kapillaren und Venolen. Dann stellten wir diese Unterscheidung jedoch ein und maßen lediglich „Gefäße“ mit bestimmten Durchmessern nach Geschwindigkeit, Durchmesser, Leukozyten usw., um nicht versehentlich eine falsche Zuordnung der Gefäßtypen zu machen.

Das Lungenallograft lässt einen Blutfluss entstehen, indem es mit den Kammergefäßen Kontakt aufnimmt. Bereits an Tag 3 scheinen sich die Blutgefäße in der Peripherie des Lungenallograftes in das Kammergewebe auszubreiten. Die Gruppe Sikora et al. zeigt sehr eindrückliche Bilder, auf denen man erkennen kann, wie die kleinen Gefäße der Allografte kleine Äste bilden und in die gut durchbluteten Kammergefäße sprießen. An Tag 9 war eine komplette Revaskularisation durch die multiplen Verbindungen von Kammergefäßen und Gefäßen der Lungenstücke entstanden.

6.1.3.8 Histologien und hämodynamische Parameter

Sowohl die Gruppe aus San Diego wie auch wir machten zusätzlich histologische Untersuchungen. Das Vorgehen war beide Male ähnlich: Gewebeabschnitte, die sowohl die Lungenallografte wie auch Gewebestücke aus dem Kammergewebe enthielten, wurden exzidiert und in Formalin fixiert. Sikora et al. benutzten dafür 10%-iges Formalin und fixierten das Gewebe über Nacht. Unsere Studiengruppe verwendete 4%-ige Formaldehydlösung bei 4°C, und das Gewebe wurde für 24 Stunden fixiert. Repräsentative Stücke wurden in beiden Varianten in Paraffin gebettet und in Schichten von 3-5 µm geschnitten. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit Hämatoxylin und Eosin (H&E), um die unterschiedlichen Strukturen darstellen zu können, und um das Vorhandensein von Lungenzellarchitektur zu bestätigen.

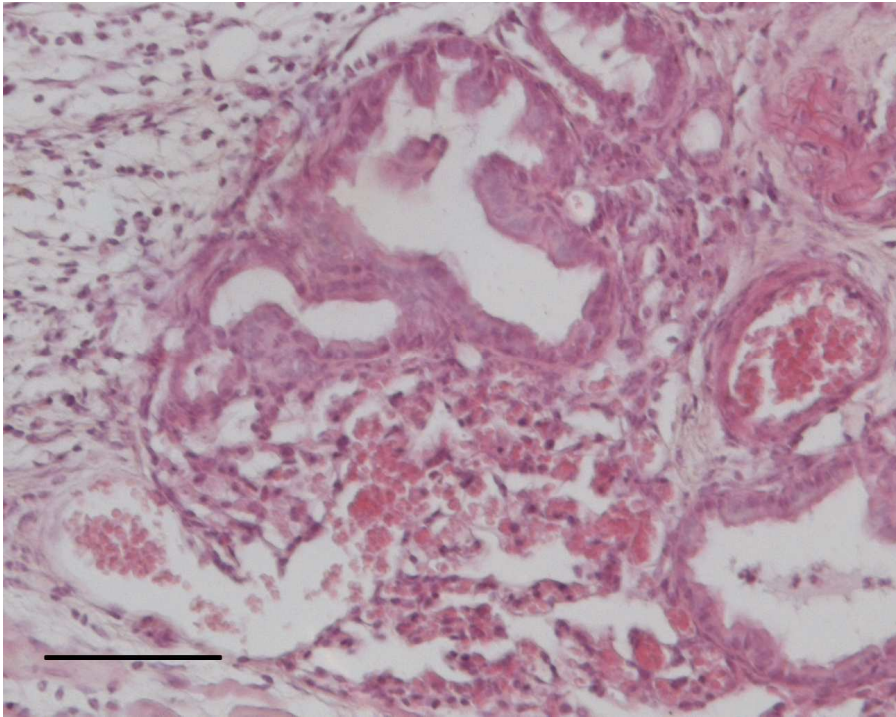


Abbildung 111: Histologie der ektop transplantierten Lungenstücke (Strich entspricht 100 μm)

Wie in Abbildung 111 sichtbar, erkennt man an Tag 14 sehr gut die für Lungengewebe typischen Strukturen mit Alveolen und Gefäßen. Die histologischen Schnitte der transplantierten Lungenstücke unterscheiden sich nicht von histologischen Bildern mit normalem Lungengewebe. Im Gegensatz zu den Arealen mit Kammergewebe erkennt man in den Gewebsabschnitten mit Lungegewebe Bronchus und bronchoepitheliale Zellen mit hervorstehenden Zilien, die den Bronchus auskleiden. Die Amerikaner beschreiben bei ihren histologischen Schnitten, dass das alveoläre und das lymphatische Gewebe kollabiert und das Lungenparenchym zusammengepresst erscheinen. Das gesamte Lungegewebe sei frei von Zeichen, die auf eine nichtspezifische Entzündung hindeuten würden. Es gab keinen Neutrophilenzustrom in das Gewebe oder die Lungengefäße. Das Gewebe behielt die Gefäß- und Zellintaktheit bei, wie diese bei normalem Lungengewebe beobachtet wird. Die Kalifornier erklären, wie bei ihren histologischen Schnitten ein klares Muster von Arteriolen, Kapillaren und venöser Blutversorgung erkennbar sei. Der durchschnittliche Durchmesser der Arteriolen war bei ihnen $22.7 \pm 7.8 \mu\text{m}$, während der von Venolen $26.4 \pm 13.1 \mu\text{m}$ war. Die Venolen hatten sehr verschiedene Durchmesser.

Wir maßen - wie bereits vorher erklärt - lediglich Lungengefäße, ohne die Aufteilung in Arteriolen und Venolen. An Tag 3 nach Implantation betrug der Durchschnittsdurchmesser $31.4 \pm 33.85 \mu\text{m}$, während er an Tag 14 nur noch $16.86 \pm 8.4 \mu\text{m}$ betrug. Sikora et al. maßen die mikrohämodynamischen Parameter wie Blutfluss, Erythrozytengeschwindigkeit und Scherungsraten im revaskularisierten Gewebe. Ebenso konnten

sie beobachten, wie FITC-markierte Erythrozyten das gesamte Gefäßnetzwerk des ektopen Lungengewebes durchqueren, ohne irgendwo hängen zu bleiben. Die Geschwindigkeit der Erythrozyten in Arteriolen und Venolen war 609 ± 354 und $977 \pm 921 \mu\text{m}/\text{sec}$. Die Wandscherungsraten in unstimulierten Lungenallograftgefäßen bewegte sich zwischen 147 ± 95 und $202 \pm 163 \text{ Sekunden}^{-1}$, und die Geschwindigkeit markierter Leukozyten war 605 ± 334 , beziehungsweise $789 \pm 473 \mu\text{m}/\text{sec}$ in Arteriolen und Venolen. Die Werte der mikrohämodynamischen Parameter, die in den Lungengefäßen beobachtet wurden, waren denen sehr ähnlich, die bereits für die Lungenmikrozirkulation vom Kaninchen am Modell des Thoraxfensters („thoracic window model“) beschrieben worden sind.

6.1.3.9

Deformierung der Leukozyten

Die Amerikaner untersuchten die Deformation der Leukozyten. Eine erkennbare Deformation der Leukozyten war erkennbar in den Kapillaren der Lungenallografte. In den Arteriolen der ektopen Lungenstücke waren keine deformierten Leukozyten sichtbar. Dies lässt vermuten, dass die Leukozytendeformierung dann geschieht, wenn Leukozyten die Arteriolen bereits passiert haben, um dann die Kapillarmikrozirkulation zu passieren. Der Teil der Leukozyten, der das Kapillarbett wieder verlassen hatte, um dann in die postkapillaren Venolen zu rollen, war entweder sphärisch oder gestreckt. Einigen Leukozyten jedoch gelang es nicht, wieder aus den Lungenkapillaren hinaus zu fließen, und sie blieben als sphärische oder gestreckte Zellen für längere Zeit in den Mündungen ($32.1 \pm 6.8\%$ aller Leukozyten) oder innerhalb der Kapillarsegmente ($34.5 \pm 7.8\%$ aller Leukozyten) hängen. Es gab jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Anzahl deformierter oder sphärischer Leukozyten, die in TNF- α -stimulierten Kapillaren hängen blieben gegenüber denen, die in unstimulierten Kapillaren der Lungenallografte hängen blieben (38.8 ± 14.4 vs. $51.6 \pm 18\%$ aller Leukozyten, $P < 0.05$).

6.2 Hypoxie-Hyperoxie-Serien

Eine unserer Versuchsreihen bestand darin, Mäuse, denen 3 Tage vorher in gut abgeheilten Rückenhautkammern jeweils 3 Lungenstücke oder 2 Lungen- und 2 Endometriumstücke implantiert worden waren, verschiedene Sauerstofffraktionen über eine Gesichtsmaske zu applizieren (Versuchsaufbau siehe 4.10.2). So wurden durch das Intra vitamikroskop die Gefäße der ektopen Gewebestücke und die der Kammer beobachtet und für die spätere Ausmessung mit dem Videorecorder aufgenommen. Dies geschah zunächst unter Raumluft und dann in einem zweiten Schritt für jeweils 90 Minuten für eine Hälfte der Tiere während der Gabe von 100% Sauerstoff, die andere Hälfte der

Tiere erhielt 10% Sauerstoff über eine Atemmaske. Anschließend wurden bei beiden Gruppen 90 Minuten lang die Gefäße bei Raumluft analysiert. Auf diese Weise wurde bei der einen Hälfte eine Hypoxie und bei der anderen eine Hyperoxie erzeugt und dabei die Gefäße der ektopen Organe und auch die Muskelarteriolen der Rückenhautkammer im Intravitalmikroskop beobachtet, mit Videokassette aufgenommen und dann offline am Bildbearbeitungssystem Cap Image ausgewertet. Wie im Ergebnisteil 5.3 erläutert verhielten sich die Lungenarteriolen genau entgegengesetzt zu den Muskel- und Endometriumarteriolen: Bei einer Hypoxie kam es innerhalb der Lungenstücke zu Vasokonstriktion der Gefäße und in den Muskelarteriolen zu einer Dilatation. Dies ist die physiologische Reaktion, wie sie auch im menschlichen Körper zu finden ist. Mit dieser Reaktion sichert der Körper immer die größtmögliche Sauerstoffsättigung seiner Hämoglobinmoleküle. Die Gewebe in der Peripherie weiten ihre Gefäße, wenn der Sauerstoffgehalt des Blutes zu niedrig ist. Auf diese Weise stellen sie sicher, dass sie - wenn der Sauerstoffgehalt niedriger ist - zumindest mehr an Volumen des sauerstoffarmen Blutes erreicht und dadurch die Menge an Sauerstoff steigt. In den Lungen ist genau das gegenteilige Prinzip von Vorteil, was mit der Lungenarchitektur zusammenhängt. Die Lungenarteriolen liegen ganz dicht neben den Bronchiolen, so dass die O_2 - und CO_2 -Moleküle in beide Richtungen durch die Membranen diffundieren können. Sobald in einem Bronchiolus Luft mit zu wenig Sauerstoffgehalt ist, kommt es zum Euler-Liljestrand-Mechanismus: Die hypoxische Pulmonalvasokonstriktion ist eine physiologische selbstregulierende Antwort auf alveoläre Hypoxie, die den pulmonalen Kapillarblutfluss zu Arealen mit viel Sauerstoff hinlenkt. Dieses Prinzip, auch Euler-Liljestrand-Mechanismus genannt, optimiert so den Gasaustausch an der Blut-Luft-Grenzfläche (Marshall, Marshall, Benumof, & Saidman, 1981; Orchard, Sanchez, & Sykes, 1983). Aufgrund der gegensätzlichen Funktionen von Lungengefäßen und systemischen Gefäßen, Sauerstoff ansammeln und verteilen, haben sie verschiedene Reaktionen auf Hypoxie entwickelt. Während die meisten systemischen Gefäße eines erwachsenen Organismus während Hypoxie dilatieren, konstringieren Pulmonalgefäße (Sommer et al., 2008). Dieser Mechanismus wurde von EULER und LILJESTRAND bereits 1946 entdeckt. Zwar wurde schon vorher ein Anstieg des Pulmonalarteriendruckes als Antwort auf alveoläre Hypoxie entdeckt, doch Euler und Liljestrand fanden heraus, dass das Anpassen der Ventilation mit der Perfusion der Grund für diese Reaktion war. Sie bemerkten eine 50% Zunahme im Pulmonalarterienwiderstand als Antwort auf einen alveolären Partialdruck (PA_{O_2}) von unter 50mmHg (Motley & Cournand, 1947).

Sikora et al. stellen eine Studiengruppe dar, die ebenfalls Lungengewebe in die Rückenhautkammer der Maus transplantiert. Ansonsten wurde bisher nur mit dem Tho-

raxfenster-Modell („thoracic window“) gearbeitet, um die Mikrogefäße der Lunge darstellen zu können. Bei dem Thoraxfenster-Modell besteht der Vorteil, dass die Lunge an ihrem Ort bleiben kann und dort unter physiologischen Bedingungen beobachtet werden kann. Das Modell der Rückenhautkammer kann dies nicht bieten, so hat es jedoch andere Vorteile, wie z.B., dass die Mikrogefäße intravitalmikroskopisch dargestellt werden können, ohne Einbußen durch die kardiorespiratorischen Bewegungen in Kauf nehmen zu müssen. Die Lungenstücke sind jedoch im Gegensatz zu dem anderen Modell nicht an ihrem physiologischen Ort, sondern ektop, also an einer fremden Stelle implantiert. Hier galt es nun für uns festzustellen, ob diese implantierten Lungenstücke innerhalb der Rückenhautkammer in einer anderen Empfängermaus sich wie normales Lungengewebe verhalten, oder ob sie die Gefäßeigenschaften der Muskelarteriolen, also des Kammergewebes, übernehmen. Die Ergebnisse, wie unter 5.3 beschrieben, legen nahe, dass die ektopen Lungenstücke die pulmonalen Eigenschaften der Gefäßstrombahn beibehalten, obwohl sie nicht ventiliert sind. Dies lässt ferner vermuten, dass die Gewebe auch sonst ihre Eigenschaften beibehalten. Der größte physiologische Stimulus, die Hypoxie, ist also bei den ektopen Lungenstücken sicher gleich zum normalen Lungengewebe. Andere Mediatoren wurden in dieser Studie jedoch nicht überprüft. Aber zumindest in dem wichtigsten Punkt verhalten sich die beiden Gewebe gleich. Dadurch gewinnt unsere Rückenhautkammer als Modell ganz enorm an Bedeutung. Das heißt also, dass alle Versuche, die wir weiter mit Lungengewebe in der Rückenhautkammer durchführten und auch solche, die noch kommen, sehr repräsentativ sind, da sich die transplantierten Lungenstücke tatsächlich zumindest in dem wichtigsten Punkt wie normales Lungengewebe verhalten. Dies ermöglicht nun eine ganze Bandbreite an neuen Versuchen an den Lungenstücken in der Rückenhautkammer. Dieses Ergebnis war deshalb von uns von enormer Bedeutung, da so die anderen von uns durchgeführten Versuchsreihen wesentlich an Bedeutung gewinnen.

6.3 Ischämie-Reperfusionsschaden

In dieser Versuchsreihe wurde ein ischämischer Schaden mithilfe eines Gummiringes an einem der implantierten Lungenstücke in der Rückenhautkammer für den Zeitraum von einer Stunde gesetzt (wie unter 4.6 erklärt). Die übrigen Lungenstücke innerhalb derselben Kammer dienten als Kontrolle. Die gesetzte Ischämie zeigte folgende Auswirkungen (siehe 5.4): Der Blutfluss sistierte, das Gewebe war für einige Tage sichtbar geschädigt, und das umliegende Kammergewebe bildete ein Ödem. Auch die Gefäßstruktur schien sich zu verändern. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die gewählte Methode mithilfe des Gummiringes erfolgreich war: Es kam zu einer im Intravital-

mikroskop nachgewiesenen Ischämie während dieser Zeit. Es war jedoch nicht möglich, die Stärke der Ischämie zu objektivieren: War der Stempel nicht fest genug angezogen, konnte in der Kontrolle im Intravitalmikroskop ein Blutfluss festgestellt werden, und der Stempel wurde darauf minimal stärker angezogen, bis der Blutfluss sistierte. Auch wenn der Fluss bei der ersten Kontrolle bereits gestoppt war, wurde nach einigen Minuten erneut kontrolliert, und gelegentlich kam es vor, dass die Schraube erneut nachgezogen werden musste, da plötzlich ein geringer Blutfluss aufgetreten war. Vermutlich hatte hier der Druck auf das Gewebe etwas nachgelassen. Es ist aber auch möglich, dass beim Quetschen etwas Gewebeflüssigkeit mobilisiert wurde und entsprechend nach einer Zeitspanne von einigen Minuten wieder ein Fluss in den Gefäßen vorzufinden war. Bei diesem Vorgehen muss zwischen erstens einer Ischämie und zweitens einer Quetschung unterschieden werden. Ziel bei dieser Versuchsreihe war es, die Erste zu optimieren. Es ist nicht ganz auszuschließen, dass das Lungengewebe minimal auch gequetscht wurde, da es sich jedoch um einen Ischämiering handelte, dürfte innerhalb dieses Ringes das Gewebe nur minimal betroffen sein. Eine Ischämie trat sicher auf, dies konnte mithilfe des Intravitalmikroskopes kontrolliert werden. Es wurde hier versucht, eine Optimierung zwischen Quetschung und Ischämie herzustellen, das Kammergewebe nur gerade so stark zu quetschen, wie nötig war, um eine Ischämie der Lungengefäße zu provozieren.

Direkt nach dem Öffnen des Ischämienstempels sistierte der gestoppte Blutfluss für eine Weile und fing erst nach wenigen Stunden wieder langsam zu fließen an. Das entstehende Ödem konnte bildlich festgehalten werden. Zu sehen war, dass das betroffene Gewebe für viele Stunden geschädigt war. Das gebildete Gewebeödem war nach einigen Tagen rückläufig. Nach dieser Zeit waren keine Auswirkungen des Ödems und keine Folgeschäden mehr sichtbar.

In dieser Versuchsreihe ging es vorrangig darum, den Schaden, der durch die Ischämie entsteht, genauer zu untersuchen, zu charakterisieren, um uns damit auf die nachfolgend beschriebenen Homing-Versuche vorzubereiten. Es konnte festgestellt werden, dass eine totale Ischämie zustande kam. Dieses hier entwickelte Schadensmodell eignet sich also zur Analyse des ischämischen Schadens in der Lunge. Bei der vorliegenden Studie wurde dieses entwickelte Modell zur Untersuchung des Homing der endothelialen Progenitorzellen herangezogen. Auch für weitergehende Untersuchungen der Ischämie des Lungengewebes scheint dieses Schadensmodell geeignet.

6.4 Homing der endothelialen Progenitorzellen

6.4.1 Endotheliale Progenitorzellen allgemein

Vaskuläre endotheliale Zellen kleiden mit einer zellstarken Schicht die gesamten Gefäße unseres Körpers aus. Sie stellen dadurch die Grenzfläche zwischen den Gefäßen selber und den Blutzellbestandteilen dar. Von dieser Position aus regulieren die endothelialen Progenitorzellen auf beiden Seiten eine Menge an essenziellen Prozessen mit der Hilfe von molekularen Signalen. Im Normalzustand hat das Gefäßendothel eine non-adhäsive Oberfläche in Bezug auf die zirkulierenden Leukozyten und auf die Plättchen, was zu einer Hemmung der Blutgerinnung führt. Als Reaktion auf bestimmte Stimuli ändert sich das Endothel jedoch schlagartig und lockt die Zellen zu verletztem oder infiziertem Gewebe. Das normale Endothel spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus durch die Produktion und Freisetzung von NO, was zur Relaxation der glatten Muskelzellen in den Gefäßwänden führt. In einer Vielzahl von Krankheitsstadien, inklusive Arteriosklerose, kann dysfunktionales Gefäßendothel zu einer erhöhten Leukozytenadhäsion, beeinträchtigten NO-Produktion und Gefäßrelaxation führen (Rosenzweig, 2003).

Endothelzellen sind auch an der Formierung neuer Blutzellen entscheidend beteiligt. Diese neu entstandenen Gefäße haben eine nützliche Rolle beim Heilungsprozess an Wunden, ischämischen Gewebe oder Infarkten. Andererseits scheinen sie auch bei der Tumorprogression und Metastasierung und bei der Neovaskularisierung, die bei der diabetischen Retinopathie gesehen wurde, eine wichtige Rolle einzunehmen. Bis vor Kurzem war man der Auffassung, dass die Formierung neuer Gefäße bei Erwachsenen ausnahmslos durch die Extension ausgereifter existierender Blutgefäße und dem ihnen zugehörigen Endothel geschieht. Eine wachsende Zahl an Beweisen lässt nun vermuten, dass endotheliale Progenitorzellen, die aus dem Knochenmark herleiten, im Blut zirkulieren und, zumindest in Tiermodellen, eine wichtige Rolle in der Formierung neuer Blutgefäße in diesen pathologischen Situationen spielen (Rosenzweig, 2003).

Der lange Weg vom Knochenmark zum Gefäßendothel kann in drei Stadien eingeteilt werden. Als erstes werden die endothelialen Progenitorzellen mobilisiert und aus dem Knochenmark freigelassen. Es scheint, dass eine Menge an Zytokinen und Wachstumsfaktoren diesen Schritt fördern. Nachfolgend bewegen sich die Zellen durch die Zirkulation und scheinen sich bevorzugt in Zonen mit geschädigtem Gewebe niederzulassen. Schließlich werden einige endotheliale Progenitorzellen in neue Blutgefäße aufgenommen, die durch Extension von bereits existierenden Gefäßen (Angiogenese) oder möglicherweise *in situ* geformt werden (Vaskulogenese) (Rosenzweig, 2003).

Diese Prozesse können wichtige klinische Verwicklungen haben. Zunächst einmal können genetische oder aber auch erworbene Defekte während dieser Stadien die Bildung neuer Blutgefäße behindern und können daher zu einem erschwerten Heilungsprozess bei den Patienten führen. Des Weiteren können endotheliale Progenitorzellen eine Möglichkeit zur therapeutischen Intervention darstellen, entweder durch Steigerung der Mobilisation, Migration, durch die Aufnahme von endogenen endothelialen Progenitorzellen oder durch Transplantation von exogenen Zellpopulationen, die *in vivo* expandiert wurden. In Tiermodellen haben beide dieser Ansätze gute Ergebnisse gezeigt. Zusätzlich konnten klinische Studien demonstrieren, dass die Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen durch die Behandlung mit Medikamenten wie Statinen signifikant gesteigert werden konnte (Rosenzweig, 2003).

In einer Studie von Hill et al. 2003 wurden endotheliale Progenitorzellen in 45 Männern ohne kardiovaskuläre Erkrankungen untersucht. Wie auch in Studien mit Patienten mit bekannter kardiovaskulärer Vorerkrankung konnten die Autoren eine inverse Korrelation zwischen der Anzahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen und den Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen feststellen (Hill et al., 2003). Die Zahl der endothelialen Progenitorzellen war weiterhin assoziiert mit der Brachialarterienreaktivität, einem Index der Endothelfunktion (NO Freisetzung), der noninvasiv gemessen werden kann. Es ist durchaus möglich, dass diese Assoziation einen normalen pathophysiologischen Prozess widerspiegelt, eher als eine kausale Verbindung zwischen den Beobachtungen. Die Erklärung, die von den Autoren favorisiert wird, ist die faszinierende Möglichkeit, dass endotheliale Progenitorzellen ihre endotheliale Funktion in reifen Blutgefäßen beibehalten und dass das Versagen dieser Funktion zu abnormaler Vasoreaktivität führen kann. Es scheint, dass endotheliale Progenitorzellen einen nützlichen Index an kumulativen kardiovaskulären Risiken und vaskulären Funktionen bereitstellt (Rosenzweig, 2003).

Diese Studien unterstützen die zunehmende Gewissheit, dass adulte Zellen und Gewebe wesentlich mehr Plastizität und Potential zur Regeneration haben als zuvor vermutet. Wir müssen noch viel über die Funktionen der endothelialen Progenitorzellen lernen, nicht nur im Kontext von Krankheiten, sondern auch im Zusammenhang mit Gefäßhomöostase. Die Identifikation von spezifischen Markern für endotheliale Progenitorzellen würde weitergehende Studien stark vereinfachen und könnte die wichtige funktionale Heterogenität in diesen Zellpopulationen betonen. Es steht noch aus, ob es möglich sein wird, diese endothelialen Progenitorzellen zur Steigerung der Bildung von neuen Blutgefäßen in der Wundheilung oder Ischämie, ohne die nachteiligen Konsequenzen der Neovaskularisation, zu benutzen. Bisher weiß man sehr wenig über die Verkehrssignale, die die zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen zu verletztem

Gewebe hin lenken, was deren Inkorporation in die neuen Gefäße bewirkt. Ein Verständnis dieser Prozesse, was eine weitergehende Forschung mit klinischen und Grundlagenstudien bedeutet, könnte uns wichtige Einblicke in die spezifische Gefäßformation bieten. Dieses Wissen wiederum könnte uns helfen, das regenerative Potenzial der endothelialen Progenitorzellen zu nutzen.

6.4.2 Diskussion unserer Ergebnisse inklusive Histologie

Nachdem das Setzen der Ischämie erprobt und die Ischämie charakterisiert worden war, wurde in einer weiteren Versuchsreihe eine Ischämie an einem der drei ektopen Lungenstücke in der Rückenhautkammer gesetzt, um unter diesen Gegebenheiten das Verhalten von endothelialen Progenitorzellen zu erforschen. Wie unter 4.10.5 beschrieben, wurde die Ischämie des Lungenstückes für eine Stunde hergestellt, dann eröffnet, und eine Stunde nach Reperfusion wurden intravenös die endothelialen Progenitorzellen gespritzt. Die farblich markierten Stammzellen konnten im Rhodaminfilter des Intravitalmikroskopes sichtbar gemacht werden. Das Ergebnis der vorliegenden Studie war, dass sich ganz klar die Mehrheit der gespritzten Zellen in der ischämischen Lunge wieder fand. In den Kontrolllungen fanden sich wesentlich weniger endotheliale Progenitorzellen, und im Kammergewebe waren nur vereinzelte Stammzellen sichtbar. Fraglich ist, ob die Stammzellen auch ohne besondere Anreize vermehrt in das Lungengewebe wandern. Möglicherweise bleiben sie dort - im Gegensatz zu den Muskelarteriolen - in den Gefäßverzweigungen bevorzugt hängen. Es könnte aber auch sein, dass bestimmte Lockstoffe sie in die Lunge wandern lassen. Es muss also einen Grund dafür geben, warum die Zellen vermehrt in die Lungengefäße wandern. Wenn man nun die ischämischen und die nicht-ischämischen Lungenstücke miteinander vergleicht, stellt man fest, dass in den ischämischen Lungenstücken signifikant mehr EPC vorhanden sind als in den Vergleichslungen. Diese Differenz lässt darauf schließen, dass die Ischämie oder die Manipulation, die wir durch die Ischämie verursacht haben, eine Rolle für das Homing der EPC spielt. Es ist sonst nicht zu erklären, weshalb in der geschädigten Lunge so viel mehr Stammzellen aufzufinden sind als in den Kontrolllungen. Des Weiteren ist zu klären, wie das Homing funktioniert. Senden die geschädigten Lungengewebe Lockmittel? Was veranlasst die endothelialen Progenitorzellen dazu, zu der ischämischen Lunge zu wandern und/oder dort zu bleiben? Es wäre noch interessant zu wissen, ob dieses Phänomen bei Schäden jeglicher Art zutrifft oder ausschließlich nach Ischämie. Diese Hintergründe gilt es nun weiter zu erforschen.

Wahrscheinlich ist die wichtigste Basis hierzu die „klassische“ Adhäsion von Zellen. Dabei dürften bestimmte Zytokine/sonstige Botenstoffe eine Rolle spielen, und bestimmte Adhäsionsmoleküle, welche das Anhaften „spezifischer“ Zellen in einem be-

stimmten Areal bewirken. Auf diese Mechanismen und die potentiellen Zytokine und Adhäsionsmoleküle gehe ich im Folgenden ein.

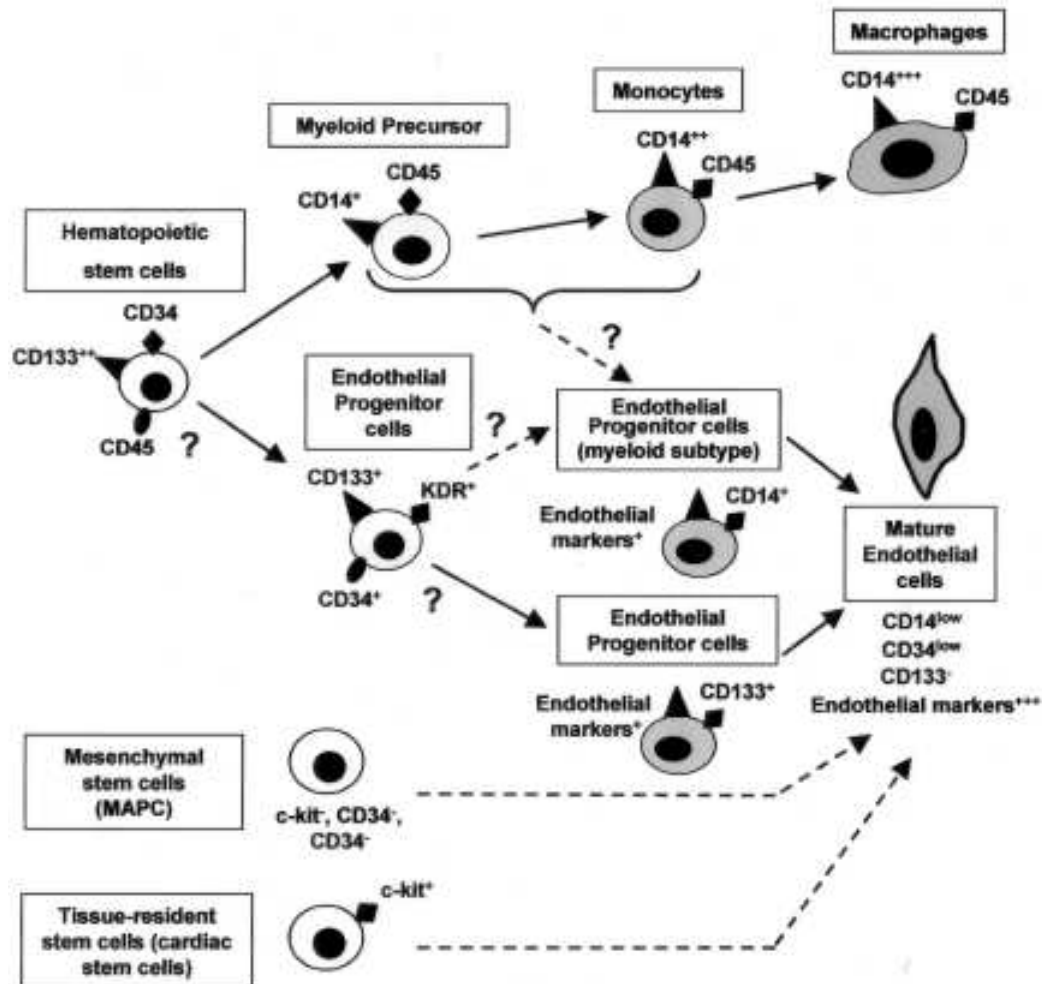


Abbildung 112: Das Schema stellt die potentielle Herkunft und die Differenzierung endothelialer Progenitorzellen von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Stammzellen dar (Urbich & Dimmeler, 2004).

Früher war man überzeugt, dass die Differenzierung von mesodermalen Zellen hin zu Angioblasten und die nachfolgende endotheliale Differenzierung ausschließlich in der Embryonalentwicklung stattfinden (Urbich et al., 2004). Dieses Dogma wurde verlassen, als in 1997 Asahara und Kollegen veröffentlichten, dass gereinigte CD34⁺ hämatopoetische Progenitorzellen von Erwachsenen *ex vivo* zu einem endothelialen Phänotyp differenzieren können (Urbich et al., 2004). Diese Zellen wurden „endotheliale Progenitorzellen“ (EPC) genannt, besaßen endotheliale Marker und verbanden sich in Neogefäßen an Orten von Ischämie. Die Identifikation und die Herkunft von endothelialen Progenitorzellen, die aus peripherem Blut isoliert werden, werden kontrovers diskutiert (Urbich et al., 2004). In peripheren Blutzellen gibt es verschiedene mögliche Quellen für endotheliale Zellen: (1) Die kleine Anzahl an hämatopoetischen Stammzellen, (2) Myeloidzellen, die zu Endothelialzellen differenzieren können, (3) andere zirkulie-

rende Progenitorzellen und (4) zirkulierende ausgereifte Endothelialzellen, die von der Gefäßwand abgeschilfert sind (Mutin et al., 1999) und an die Kulturschale anheften (Urbich et al., 2004).

Obwohl die Rolle von endothelialen Progenitorzellen bei der Neovaskularisierung überzeugend gezeigt werden konnte, bleibt die Frage: Wie steigern endotheliale Progenitorzellen die Neovaskularisierung (Urbich et al., 2004)? Die grundlegende Aufnahmerate von Progenitorzellen ohne Gewebstrauma ist sehr niedrig (Crosby et al., 2000b). In ischämischem Gewebe variiert die Aufnahme von genetisch markierten Knochenmarkszellen, die endotheliale Marker Proteine besitzen, von 0-90% (Jackson et al., 2001; Lyden et al., 2001; Crosby et al., 2000a; Llevadot et al., 2001; Murayama et al., 2002; Garcia-Barros et al., 2003; De Palma, Venneri, Roca, & Naldini, 2003).

Die Applikation von verschiedenen hämatopoetischen Stammzellpopulationen und *ex vivo* expandierten endothelialen Progenitorzellen erhöhen die Neovaskularisierung von ischämischem Gewebe und steuern zur Re-Endothelialisierung nach Endothelverletzungen bei. Diese Tatsache liefert neuartige Therapieoptionen. Die Anzahl an aufgenommenen Zellen mit einem endothelialen Phänotyp in ischämisches Gewebe ist generell sehr niedrig. Wie kann also eine so kleine Zahl an Zellen die Neovaskularisation so sehr steigern? Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Effizienz der Neovaskularisierung nicht allein durch die Aufnahme von EPC in neu gebildeten Gefäßen beeinflusst wird, sondern auch durch die Freisetzung von pro-angiogenen Faktoren durch parakrine Weise (Urbich et al., 2004). Die endothelialen Progenitorzellen verhalten sich eventuell ähnlich wie die Monozyten/Makrophagen, die die Arteriogenese durch das Bereitstellen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren steigern können. In der Tat zeigten EPC, die von verschiedenen Quellen kultiviert wurden, Wachstumsfaktoren wie VEGF, HGF und IGF-1 (Urbich et al., 2004). Die Freisetzung von Wachstumsfaktoren könnte wiederum den klassischen Prozess der Angiogenese beeinflussen, nicht nur die Proliferation und die Migration, sondern auch das Überleben von ausgereiften Endothelzellen (Folkman, 1995a). Im Gegensatz dazu, konnte eine Applikation von Makrophagen, die dafür bekannt sind, Wachstumsfaktoren freizusetzen (Berse, Brown, Van de, Dvorak, & Senger, 1992; Polverini et al., 1977), und aber nicht in Gefäßstrukturen aufgenommen worden waren, nur einen kleinen Anstieg der Neovaskularisierung nach Ischämie induzieren. Dies deutet darauf hin - beweist aber nicht -, dass die Kapazität von endothelialen Progenitorzellen zu Gefäßstrukturen beisteuern, zu ihrer Befähigung beiträgt, Neovaskularisierung zu steigern (Urbich et al., 2004).

Verschiedene Studien zeigen, dass zirkulierende endotheliale Progenitorzellen, unabhängig von ihrer Herkunft, eine wichtige Funktion als endogener Reparaturmechanis-

mus ausüben, um die Integrität der endothelialen Monoschicht durch Austauschen von abgetragenen Teilen der Arterie zu erhalten (Urbich et al., 2004).

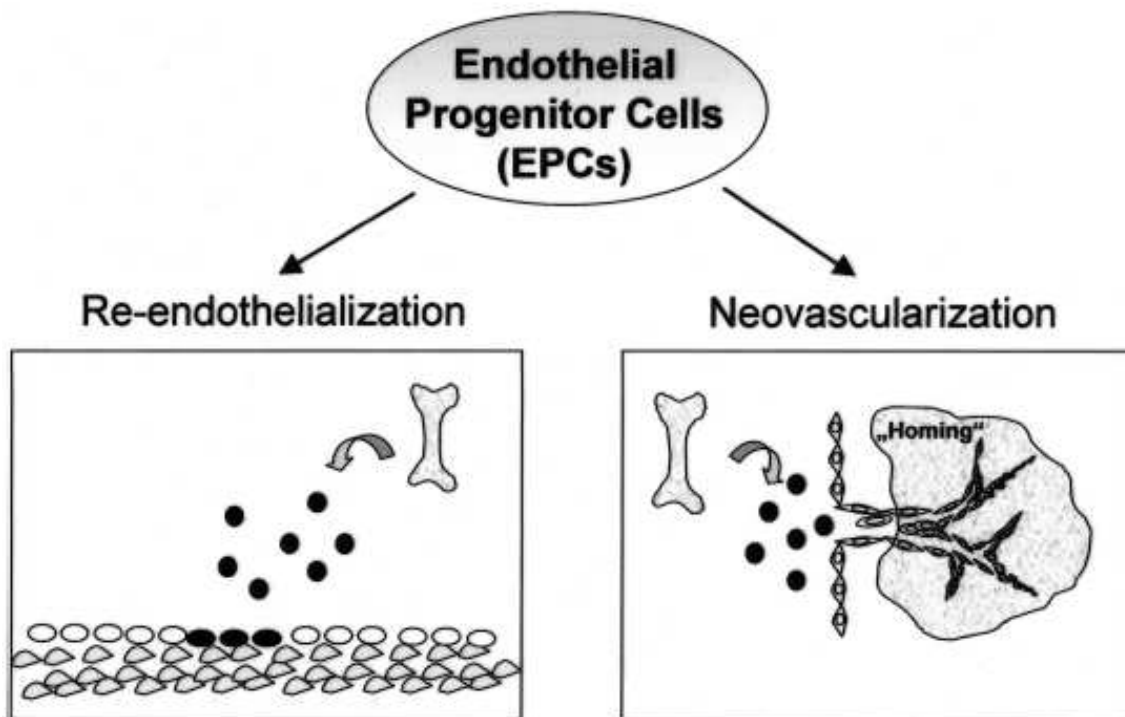


Abbildung 113: Die Rolle von EPC in der Gefäßbiologie: Eine Injektion von EPC verbessert signifikant die Reendothelialisation und Neovaskularisation nach Verletzung (Urbich et al., 2004).

Dadurch, dass endotheliale Progenitorzellen zur Re-Endothelialisierung und Neovaskularisierung beitragen, kann eine steigende Zahl dieser Zellen ein attraktives therapeutisches Werkzeug sein (Urbich et al., 2004).

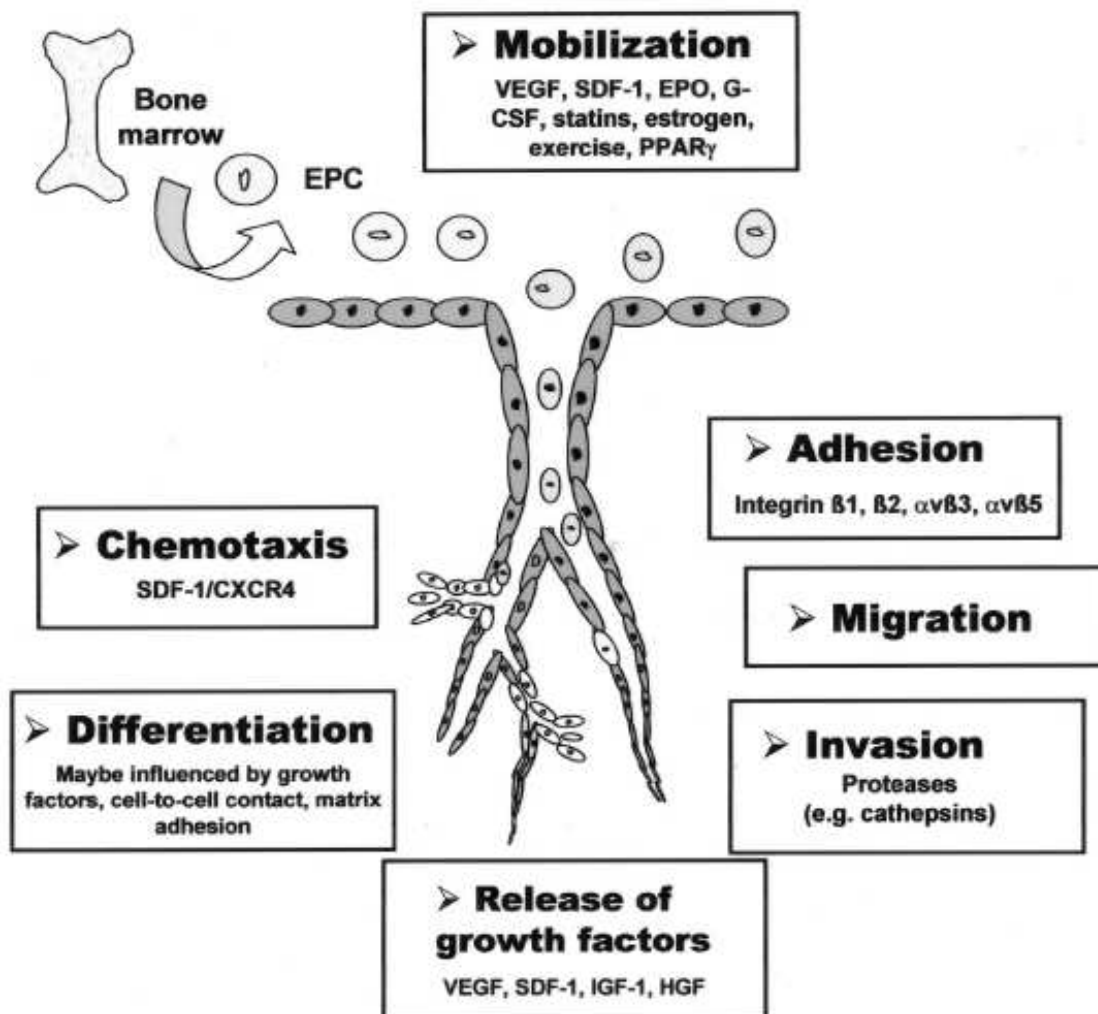


Abbildung 114: Der Homing- und Differenzierungsmechanismus von EPC: Die Rekrutierung und Aufnahme von EPC in ischämisches Gewebe erfordert einen koordinierten Prozess, der die Mobilisation, Chemoattraktion, Adhäsion, Transmigration, Migration, Gewebeinvasion und die in situ-Differenzierung beinhaltet. Die Faktoren, von denen man ausgeht, dass sie die verschiedenen Schritte beeinflussen sind, sind aufgeführt (Urbich et al., 2004).

Physiologisch gesehen ist Ischämie das dominierende Signal, um die endothelialen Progenitorzellen vom Knochenmark zu mobilisieren. Man ist hierbei der Auffassung, dass Ischämie VEGF oder SDF-1 hochreguliert (Lee et al., 2000; Pillarisetti & Gupta, 2001), die wiederum in die Zirkulation freigesetzt werden und selbst eine Mobilisation von Progenitorzellen vom Knochenmark via einem MMP-9 abhängigen Mechanismus bewirken (Takahashi et al., 1999; Gill et al., 2001a; Heissig et al., 2002; Shintani et al., 2001a).

Der initiale Schritt für das Wandern der Progenitorzellen hin zum ischämischen Gewebe involviert die Adhäsion von Progenitorzellen zu endothelialen Zellen. Diese ist aktiviert durch Zytokine, Ischämie und die Transmigration von den Progenitorzellen durch

die endotheliale Zellmonoschicht (Springer, 1994b; Carlos & Harlan, 1994; Muller, 2002).

Durch die geringe Anzahl an zirkulierenden Progenitorzellen kommt der Chemoadhäsion eine große Rolle zu, um eine angemessene Zahl an Progenitorzellen zu dem ischämischen oder verletzten Gewebe hin zu bewegen. Es konnte gezeigt werden, dass SDF-1 an der Rekrutierung der Progenitorzellen hin zu dem ischämischen Gewebe beteiligt ist (Yamaguchi et al., 2003). Einige Tage nach der Herbeiführung eines Myokardinfarkts waren die SDF-1-Proteinspiegel erhöht (Askari et al., 2003). Zudem bewirkte die verstärkte Ausschüttung von SDF-1 eine Erhöhung des Stammzell-Homings und der Inkorporation in ischämisches Gewebe (Askari et al., 2003; Yamaguchi et al., 2003). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass hämatopoetische Stammzellen lediglich auf SDF-1 sensitiv waren und nicht auf G-CSF oder andere Chemokine (z.B. IL-8 und RANTES) reagierten (Wright, Bowman, Wagers, Butcher, & Weissman, 2002). Und außerdem steigt der VEGF-Spiegel während Ischämie und ist in der Lage, als ein chemotaktischer Faktor für EPC zu wirken (Lee et al., 2000; Shintani et al., 2001a; Kalka et al., 2000). Interessanterweise bestimmte die Migrationskapazität von endothelialen Progenitorzellen oder Knochenmarkszellen gegenüber VEGF und SDF-1 die funktionale Besserung von Patienten nach Stammzelltherapie (Britten et al., 2003). Neben Genen, die direkt durch die Hypoxie hochreguliert werden, kann die Invasion von immunkompetenten Zellen zu dem ischämischen Gewebe weiter die Spiegel von verschiedenen Chemokinen innerhalb des ischämischen Gewebes erhöhen, wie zum Beispiel MCP-1 oder Interleukine, die die zirkulierenden Progenitorzellen anziehen können (Fujiyama et al., 2003).

In der Rückenhautkammer in der vorliegenden Studie befindet sich das implantierte fremde Gewebe. Es sind dort nicht nur Prozesse der Angiogenese und Vaskulogenese vorhanden, sondern angiogene Effekte wie Entzündungsherde und Umbauherde, die in diesem Maße im übrigen Körper nicht zu finden sind. Daher kann man hier nicht von einem völlig stabilen Gewebe ausgehen, es handelt sich vielmehr um ein sehr dynamisches Gewebe. Aus diesem Grund erwarten wir keinen „Schwarz-Weiß-Effekt“, sondern zumindest auch ein paar vereinzelte - wenn aber signifikant weniger - endotheliale Progenitorzellen in den nicht ischämisierten Lungengewebearealen und in der gesamten Kammer. Daher rührte die Idee, zum weiteren Vergleich die eigenen Organe der Maus wie zum Beispiel die Lunge später histologisch auf EPC zu untersuchen.

Ein weiterer Diskussionspunkt: Für die hier verwendeten Versuchsmäuse wurden endotheliale Progenitorzellen von Ratten verwendet. Dies hatte unterschiedliche Gründe. Zum einen sind endotheliale Progenitorzellen der Maus extrem schwierig zu züchten, da die Maus verhältnismäßig wenig Masse an Knochenmark und damit sehr wenige

Zellen hat. Zum anderen waren Stammzellen der Ratten bereits vorhanden. Diese halten sich extrem gut und sind äußerst stabil über 30-40 Generationen (Hamacher, 2007; Kahler et al., 2007).

Für diese letzte Versuchsreihe zur Analyse des Stammzellverhaltens wurden Nacktmäuse BALB/c verwendet. Die Nacktmaus, auch athymische Maus genannt, ist ein genetischer Mutant der Hausmaus mit fehlendem Thymus. Der Phänotyp äußert sich durch ein Fehlen der Körperbehaarung. Der fehlende Thymus bewirkt nicht nur ein Ausbleiben der Körperbehaarung, sondern auch eine starke Verringerung der Anzahl an T-Lymphozyten. Im Thymus findet die Umwandlung von Thymozyten (Prä-T-Lymphozyten) in T-Lymphozyten (T-Zellen) statt. Die Anzahl an B-Zellen bei den Lymphozyten ist in der Nacktmaus normal, während reife T-Lymphozyten fehlen (Sprent, 1974). Durch den erheblichen Mangel an T-Lymphozyten ist das Immunsystem der Nacktmaus stark eingeschränkt, was sie zu einem idealen Wirt für homologe und xenogene Transplantationen macht (Schueler, 1999). Hierbei gibt es keine vom Immunsystem induzierte Abstoßungsreaktion. Das Fehlen des Thymus bewirkt bei der Nacktmaus ein Ausbleiben der Produktion von Antikörpern, der zellvermittelten Immunantwort, der verzögerten Überempfindlichkeit, der Beseitigung von virulenten oder malignen Zellen und der Abstoßung von Fremdgewebe. Das schwache Immunsystem der Nacktmäuse verlangt eine spezielle Tierhaltung. Es sind eine besondere Nahrung, eine staubfreie Einstreu in möglichst keimfreier Umgebung, Temperaturen um 25°C und eine Luftfeuchtigkeit von 65% zur Haltung der Tiere notwendig. Die Nacktmäuse haben eine spontane Deletion im FOXP1-Gen (Fortmeyer & Bastert, 1977; Fortmeyer, 1981).

Das hier entwickelte Modell eignet sich also dafür, intravitalmikroskopisch das Homing von extrakorporal expandierten endothelialen Progenitorzellen zu studieren. Die Transmigrationsresultate legen nahe, dass dieser Prozess durch Kortikosteroide wie Dexamethason und durch Cyclooxygenase-Inhibition (NS398) wie auch durch Statine wie Simvastatin beeinflussbar ist, sowie dass für das Homing Faktoren wie VEGF, TNF, CXCL 12 (Stroma derived factor-1, SDF-1) eine Rolle spielen (Regelin et al., 2007). Dieses Modell lässt sich nun weiter variieren. Wie die Kollegin Annika Ballasz dies durchführte, können weiterführende Studien zur Optimierung der Anzahl an Stammzellen und zur Ermittlung des optimalen Zeitpunktes für das Injizieren der Stammzellen nach der Ischämie durchgeführt werden. Auch wäre es interessant, das Verhalten der EPC (insbesondere das Homing) an anderen Schadensmodellen auszuprobieren.

7 Aktuelle Studienlage und Perspektiven

Früher war die *in vivo*-Mikroskopie zur Beobachtung des Leukozytenflusses in der Lungenmikrozirkulation in der Maus nicht möglich. Das lag an der kleinen Größe des Tieres und an der Bewegung der Lunge unter den kardiorespiratorischen Zyklen. Deshalb war es nötig, ein neues Modell zu etablieren. Sowohl Sikora et al. wie auch wir benutzten ein Mausmodell und machten durch Transplantation von Lungengewebe in die Rückenhautkammer einer Maus die Lungenmikrozirkulation sichtbar. Durch die Verwendung von Intravitalmikroskopie und Histologie konnten wir feststellen, dass die Mikrogefäße des transplantierten Gewebes den Blutfluss wieder aufbauen, und dass das transplantierte Lungenallograft normale Lungengewebearchitektur besitzt. Das Lungenallograft baut einen Blutfluss auf, indem es mit den Kammergefäßen Kontakt aufnimmt. Bereits an Tag 3 erwecken die Blutgefäße in der Peripherie des Lungenallograftes den Anschein, dass sie durch Verlängern, Kontakt mit dem Kammergewebe aufnehmen. Diese Untersuchungen legen nahe, dass die revaskularisierten Blutgefäße am ehesten ihren Ursprung in den transplantierten Lungenstücken haben. Die Lungenallografte zeigen innerhalb von 5-9 Tagen ein klar definiertes Netzwerk der Lungenmikrogefäße, die je nach ihrem Verzweigungsmuster als Arteriolen, Kapillaren und Venolen erster, zweiter und dritter Ordnung klassifiziert werden können. Die Lungenmikrogefäße erschaffen einen direkten und kontinuierlichen Blutfluss, zum Beispiel von Arteriolen über die Kapillaren hin zu den Venolen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die wieder zusammengewachsenen Mikrogefäße der Lungenstücke auf Mediatoren wie Vasokonstriktor ET-1 und auf Zytokinaktivatoren mit Leukozyten-endothelialen Interaktionen reagierten. Es war zunächst denkbar, dass das Nutzen von Nacktmäusen möglicherweise den herbeigeführten Effekten von extravaskulären Stimuli schadet. Diese Vermutung wird jedoch von Sikora et al. durch die Beobachtung der ET-1-induzierten Vasokonstriktion und des TNF- α -induzierten Leukozyten-Rolling und -Adhäsion in den revaskularisierten Lungenmikrogefäßen ausgeräumt. Ein Teil der Leukozyten, die die Kapillaren passieren, veränderten ihre Form. Die implantierten Lungenallografte blieben laut Sikora et al. für einige Wochen lebensfähig (in unseren Versuchen wurden die Tiere nach Ablauf der Versuche spätestens nach 21 Tagen eingeschläfert). Die Allografte demonstrieren die charakteristischen Eigenschaften des normalen Lungengewebes. Dieses Modell eignet sich daher dafür, die Lungengefäße im Intravitalmikroskop sowohl unter akuten als auch unter chronischen experimentellen Konditionen sichtbar zu machen.

Vorherige Studien mit transplantierten neonatalen Lungenallograften des Hamsters in der Hamsterwangentasche zeigten bereits, dass die revaskularisierten Mikrogefäße die mikrozirkulatorischen Funktionen der erwachsenen Lunge beibehalten (Davis, Joyner, & Gilmore, 1981; Shepard, Joyner, & Gilmore, 1987; Davis, Gilmore, & Joyner, 1981; Myers, Joyner, & Gilmore, 1988; Moore & Khairallah, 1976). Sikora et al. weiteten diese Beobachtungen mit ihren Versuchen aus, indem sie zeigten, dass Mikrogefäße in Mäuselungenallograften, obwohl sie in immunkomprimierte Mäuse implantiert sind, die Möglichkeit haben, auf externe Stimuli wie Zytokinstimulation (induziert Leukozyten-Endothelialzell-Adhäsion) und auf vasoaktive Mediatoren (induziert Vasokonstriktion) zu reagieren. Zusätzlich sind die Ergebnisse der Scherraten, die Sikora et al. in den Lungenallograften maßen, vergleichbar mit denen, die von anderen Untersuchern im Lungenkreislauf gemessen wurden (Kuebler, Kuhnle, Groh, & Goetz, 1994; Kuhnle, Leipfinger, & Goetz, 1993b).

Die Erklärung von Mechanismen, wie zirkulierende Leukozyten mit den Lungenmikrogefäßen interagieren und nachfolgend, während Episoden von Lungenentzündung in die Lunge wandern, erfordert das Sichtbarmachen von solchen Interaktionen *in vivo*.

Mithilfe des Visualisierens von Leukozyten im systemischen Kreislauf durch das Intravitalmikroskop kann gezeigt werden, wie stark die Adhäsionsmoleküle eine initiale, aber reversible Adhäsion (Rolling) der zirkulierenden Leukozyten (inklusive der Eosinophilen) hin zu dem Gefäßendothel verursachen (Broide & Sriramarao, 2001; Springer, 1994c; Butcher, 1991). Rollende Leukozyten sind bekannt dafür, als Antwort auf aktivationsabhängige Stimulation fest zu haften und bei Entzündung in extravasale Räume zu wandern (Springer, 1994c; Butcher, 1991). Dieses Paradigma der Leukozytenadhäsion, das nachfolgend Rolling, Adhäsion und Transmigration beinhaltet, ist soweit in der Lungenmikrozirkulation der Maus bisher noch nicht untersucht gewesen. Die Studien von Sikora et al. zeigen, dass Leukozyten in TNF- α -stimulierten Mikrogefäßen des Lungenstücks sehr effizient rollen und anheften. Diese Zunahme an Rolling und Adhäsion der Leukozyten wurde während TNF-induzierter Entzündung beobachtet. Studien mit neutralisierenden Antikörpern zeigen, dass Leukozyten-Rolling in Zytokin-stimulierten postkapillären Venolen durch zweierlei vermittelt wird: Durch sowohl Leukozyten (L-Selectin) als auch endotheliale Selektine (P-Selectin allein und in Kombination mit E-Selectin), mit kleinerem Beitrag von Leukozyt $\alpha 4$ Integrinen (Sikora et al., 2003). Die Intravitalmikroskopie-Studien der Mäuselungenallografte von Sikora et al. erhärten die These, dass das Mehrstufenmodell der Leukozytenadhäsion, das sehr gut in Bezug auf den systematischen Kreislauf dokumentiert ist, auch auf den pulmonalen Kreislauf zutrifft. Im Lungenkreislauf findet das Leukozyten-Rolling und die -Adhäsion jedoch in beiden - Arteriolen und postkapillaren Venolen - statt, wohingegen im syste-

mischen Kreislauf das Rolling lediglich in postkapillaren Venolen beobachtet wird (Sikora et al., 2003). Zusätzliche Erhärtung für die mehr-Stufen-Leukozyten-Endothelial-Adhäsions-Kaskade in der Lungenmikrozirkulation findet man in einigen, jedoch nicht allen, Tiermodellen, die die Lungenmikrozirkulation visualisieren. Zum Beispiel konnte Leukozyten-Rolling und -Adhäsion in Venolen und Arteriolen normaler Lungen im Thoraxfenster („thoracic window“) bei Kaninchen gezeigt werden (Kuebler et al., 1994; Kuhnle, Leipfinger, & Goetz, 1993a). In einer Hundestudie, in der ebenfalls ein Thoraxfenster verwendet wurde, wurde bei den Leukozyten in den pulmonalen Venolen und Arteriolen ein Rolling, jedoch keine Adhäsion beobachtet, während in den Kapillaren die Leukozyten zum kurzzeitigen Stillstand kamen (Gebb et al., 1995). In einer gegensätzlichen Studie wurde Leukozytensequestration in den Lungenkapillaren bemerkt, während keine Anzeichen von Interaktion in Arteriolen und postkapillaren Venolen zu verzeichnen war (Lien et al., 1987b; Lien et al., 1990). Neuere Studien an Ratten, die isolierte, reperfundierte Lungen verwendeten, zeigten, dass Leukozyten erheblich mehr an Arteriolenwänden rollten als in Venolen (Yamaguchi et al., 1997). Im beschriebenen Mäuse-Lungenallograft-Modell nicht nur von Sikora et al. sondern auch von uns ist ein niedriger Grad an spontanem Leukozyten-Rolling und -Adhäsion in sowohl Arteriolen wie auch Venolen zu beobachten, was durch Stimuli wie Zytokine gesteigert werden kann. Dies macht das Lungenallograft zu einem hervorragenden Modell, um die Regulation der Leukozytenadhäsion in der Lunge zu untersuchen (Sikora et al., 2003).

Mit dem Lungenallograftmodell lässt sich außerdem untersuchen, ob Leukozyten intravaskulär bei ihrem Fluss durch die Kapillaren eine Formveränderung durchmachen. Die Ergebnisse von Sikora et al. zeigen, dass ein Teil der Leukozyten während der Passage durch das Kapillarbett einer Formveränderung unterliegt (verändern sich zu gestreckten oder gedehnten Formen), und dann als entweder lang gestreckte oder sphärische (die Zellen, die keine Formveränderung mitgemacht haben) in die postkapillaren Venolen weiterziehen. Bei dem TNF- α -Test von Sikora et al. vermochte TNF- α in der verwendeten Konzentration nicht die Anzahl der in Kapillaren hängen gebliebenen Leukozyten erhöhen. Dennoch gehen Sikora et al. davon aus, dass eine höhere Konzentration von TNF- α oder aber die Anwesenheit von Zytokinen möglicherweise zu einer Zunahme von hängen bleibenden Leukozyten in den Kapillaren führen könnte. Kürzlich erschienene Intravitalmikroskopie-Studien an sowohl Tier- als auch Menschenlunge zeigten, dass voll dilatierte Kapillarsegmente einen durchschnittlichen Durchmesser von $7.5 \pm 2.3 \mu\text{m}$ und eine durchschnittliche Länge von $14.4 \pm 5.8 \mu\text{m}$ (Doerschuk et al., 1993) haben, ähnlich, wie Sikora et al. und wir in den Lungenallograften beobachtet haben. Leukozyten, die die Lungenkapillaren durchqueren, kreu-

zen zwischen 45 und 90 Kapillarsegmente (Hogg, 1987; Hogg, 1991), was ihnen ausreichend Gelegenheiten bieten würde, um auf Kapillaren zu treffen, die kleiner als ihr eigener Durchmesser sind (Doerschuk et al., 1993). Studien am Elektronenmikroskop haben gezeigt, dass sich aufgrund der kleineren Größe der Kapillaren im Vergleich zu den durchquerenden Leukozytenpopulationen die intravaskulären Leukozyten einer Formveränderung unterziehen und in lang gestreckte Zellen deformieren (Doerschuk et al., 1993). Die Möglichkeit der intravaskulären Leukozyten, sich einer Formveränderung zu unterziehen (deformieren/strecken), kann sie davor schützen, bei ihrem Weg durch das Kapillarbett hängen zu bleiben (Hanger et al., 1993). Überdies zeigen Intravitalmikroskopie-Studien an einem Hunde-Thoraxfenster Modell, dass die Hälfte von polymorphonuklearen Leukozyten (PMNs) die Kapillaren passieren ohne anzuhalten, während die andere Hälfte ein oder mehrmals zum Stoppen kommt. (Heisig, 1968; Lien et al., 1987a; Lien et al., 1990; Martin, Wiggs, Lee, & Hogg, 1987b). Leukozyten dagegen wurden beobachtet, wie sie beim Fluss durch das Hundekapillarbett deformieren (Gebb et al., 1995). Außerdem stoppen Leukozyten in Mikrogefäßsegmenten des Hundes häufiger als in Gefäßeinmündungen und rollen entlang der Gefäßwände der Hundearteriolen und Venolen. Interessanterweise waren die meisten der Leukozyten, die an den Hundearteriolen entlang rollten, sphärisch, während die Leukozyten, die die Hundekapillaren passierten, als lang gestreckte Zellen deformierten und in ihrer neuen Form in den Venolen weiterzogen, ähnlich wie wir das bei den Mauseleukozyten in den Mauselungenallograftgefäßen beobachten konnten (Sikora et al., 2003). Intravitalmikroskopie-Studien der Mikrogefäße an der subpleuralen Oberfläche von Hunde- und Kaninchenlungen wie auch an der Mäuselunge in unseren und den Studien von Sikora et al. offenbaren, dass Leukozyten in allen drei Spezies mit erkennbarem Leukozyten-Rolling in den Venolen und Arteriolen während ihrer Passage durch das Kapillarbett deformieren (Gebb et al., 1995; Heisig, 1968; Lien et al., 1987a; Lien et al., 1990; Martin et al., 1987b).

Das Lungenallograftmodell der Maus bietet diverse Vorteile gegenüber dem Kaninchen- oder Hunde-Thoraxfenster Modell oder der *ex vivo* Beobachtung von isolierten perfundierten Rattenlungen. So ist zum Beispiel in dem Lungenallograftmodell eine direkte Visualisierung der Leukozyten in der Lungenzirkulation kontinuierlich möglich und ist nicht durch die Bewegung oder Form der Lungen während Atmung oder Ventilation eingeschränkt. Da genetisch entwickelte Mäuse, mit Mangel an Adhäsionsmolekülen und Reagenzien, mit denen man Leukozyt-Endothelial-Interaktionen in der Maus studieren kann, verfügbar sind, ist es wichtig, Methoden zu entwickeln, die es erlauben, die Lungenmikrozirkulation in Mäusen zu visualisieren. Während die Implantation eines Thoraxfensters bereits vor längerer Zeit in größeren Tieren wie Hunden, Kaninchen

und Ratten etabliert wurde, wurde dies von Kübler et al. an bulb/c-Mäusen durchgeführt. Dieser Versuchsaufbau hat den Vorteil, dass er geschlossene Thoraxbedingungen und physiologische pleurale Drücke aufweist. Die Lunge kann hierbei *in situ* beobachtet werden. Der Nachteil dieses Versuchsaufbaus gegenüber der Rückenhautkammer besteht in der respiratorischen Bewegung der beobachteten Lunge. Wohingegen der Vorteil darin besteht, dass bei dem Thoraxfenster tatsächlich die Lunge *in situ* beobachtet werden kann, während bei unserem Versuch lediglich ektope Lungenstücke angesehen werden können. Auch sind beim Thoraxfenster-Modell physiologische Drücke in der Lunge vorhanden, während in der Rückenhautkammer systemische Drücke herrschen, was ein weiterer Nachteil der Rückenhautkammer ist.

Die histologische Untersuchung der revaskularisierten Lungenallografte von Sikora et al. und auch die unsere zeigten zelluläre und morphologische Merkmale, die für die normale Mäuselunge typisch sind. Obwohl das Lungenallograftmodell in erster Linie entwickelt worden ist, um Leukozyten-Endothelial-Zellinteraktionen in Lungenmikrogefäßen zu studieren, sind einige Aspekte des physiologischen Umfeldes zwischen der transplantierten und der intakten Lunge anders. So empfängt die Lungenarterie zum Beispiel normalerweise desoxygeniertes Blut bei niedrigem systolischem Druck, während die Arteriolen in den Lungentransplantaten oxygeniertes Blut bei vorherrschendem systemischem Druck erhalten. Des Weiteren ist das Gewebemilieu hinsichtlich der Umgebungssauerstoffspannung und dem mechanischen Stress, der mit Respiration assoziiert ist, voraussichtlich in intakten Lungen und dem Lungenallograft ungleich. Die Leukozyten-Endothelial-Zellinteraktionen, die in den Lungenmikrogefäßen des Lungenallograftes beobachtet werden (wie zum Beispiel Rolling in Arteriolen, Hängen bleiben in den Kapillaren, etc.), stehen im Kontrast zu denen, die in den umgebenden Kammergefäßen in der Rückenhautkammer sichtbar sind. Dieses legt nahe, dass das Lungentransplantat mehrere der hämodynamischen Eigenschaften einer intakten Lunge beibehält, anders als die umgebende systemische Mikrozirkulation. Makrophagen und Mastzellen nehmen während inflammatorischer Ereignisse eine wichtige Rolle ein, da sie verschiedene Mediatoren freilassen und so die lokalen endothelialen Eigenschaften verändern. Es besteht die Notwendigkeit, ihre Beteiligung in dem transplantierten Allograft näher zu untersuchen. Dieses Modell ist in der Hinsicht einzigartig, als dass es die simultane Quantifizierung von Mikrohämodynamik und Leukozytenkinetik in den Mäuselungenarteriolen, -kapillaren und -venolen ermöglicht, indem es Fluoreszenz-Intravitalmikroskopie und *in vivo*-Labeling der Leukozyten anwendet (Sikora et al., 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Studien von Sikora et al. zeigen, dass die lokale Lungenentzündung, ausgelöst durch TNF- α , zu vermehrtem Leukozyten Rol-

ling und Adhäsion, in sowohl Arteriolen als auch Venolen, des in der Rückenhautkammer der Nacktmaus implantierten Lungenallograftes führt. Dieses Lungenallograftmodell mit neonataler oder erwachsener Lunge wird es erleichtern, die Mechanismen von Leukozyten-Endothelial-Adhäsion in Lungenmikrogefäßen und die Formveränderung der Leukozyten im Kapillarbett zu identifizieren (Sikora et al., 2003). Außerdem stellt es eine Möglichkeit dar, die pulmonalen vaskulären Reaktionen auf vasoaktive Mediatoren mittels Intravitalmikroskopie visuell zu untersuchen (Sikora et al., 2003). Mithilfe dieses Modells wird es möglich sein festzustellen, wie einzelne Teilmengen von Leukozyten, inklusive Eosinophilen, Neutrophilen, Monozyten und T-Lymphozyten, während Episoden von Entzündung der Lunge die Mikrogefäße passieren. Überdies hat dieses Mausmodell den entscheidenden Vorteil gegenüber vorher beschriebenen Tiermodellen wie an Hunden, Kaninchen und Ratten, dass die Effekte von bestimmten Gen-Deletionen (Knockout-Mäuse mit einem Fehlen an Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, Chemokinen, usw.) ohne weiteres untersucht werden können (Sikora et al., 2003).

Des Weiteren sind in dem vorgestellten Modell Vaskulogenese und Angiogenese sehr gut darstellbar. Die Vaskularität ist ein Faktor von sehr hoher Wichtigkeit und Relevanz: Zwei Drittel alle Lungenkrankheiten sind vaskulärer Natur.

Ein Nachteil des Modells ist jedoch, dass nur eine zeitlich beschränkte Beobachtung von 10-14 Tagen möglich ist. Eine längerfristige Beobachtung der Gefäßreaktionen und auch der Stammzellen wäre sicherlich interessant. Das Rückenhautkammermodell hat starke klinische Relevanz. Es können in dem Modell z.B. Tumor, Wundheilung und Ischämie improvisiert werden. Unser Modell zur Untersuchung der Ischämie und des Verhalten von Stammzellen hat sich bewährt. Der Aufbau des Rückenhautkammermodells an sich existierte bereits, jedoch konnte jetzt mit den Hypoxie-Hyperoxie-Serien der wichtigste Parameter von Lungengewebe für die ektopen Lungenstücke gezeigt werden. Dieses Modell lässt sich in Zukunft vielfältig ausbauen. Eine Möglichkeit wäre, Inhibitoren zu applizieren, wie z.B. Angiogeneseinhibitoren, inflammatorische Inhibitoren (AK CXCR-4, AK CXCR-12). Weiter könnte im Sinne einer Dosis-Wirkungsbeziehung oder Zeit-Wirkungs-Beziehung der Einfluss der Ischämiezeit und der Dosis der gegebenen endothelialen Progenitorzellen auf die Ischämie untersucht werden. Auch könnten die Zeitpunkte der Stammzellgabe nach Ischämie variiert und miteinander verglichen werden. Des Weiteren kann das Homing moduliert werden, indem z.B. Rezeptoren geblockt oder die Stammzellen stimuliert werden.

In vitro wurde von der Kollegin Theresa Knaupp bereits eine Modulation der Transmigrationsassays erreicht. Dies ist gegenwärtig *in vivo* noch durchzuführen.

8 Literaturverzeichnis

1. PF4 platelet factor 4 [Homo sapiens]. (2010). pubmed: Entrez Gene .
Ref Type: Internet Communication
2. Abe, S., Boyer, C., Liu, X., Wen, F. Q., Kobayashi, T., Fang, Q. et al. (2004). Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 170, 1158-1163.
3. Abels, C., Szeimies, R. M., Steinbach, P., Richert, C., & Goetz, A. E. (1997). Targeting of the tumor microcirculation by photodynamic therapy with a synthetic porphycene. *J Photochem.Photobiol.B*, 40, 305-312.
4. Abraham, D. & Dashwood, M. (2008). Endothelin--role in vascular disease. *Rheumatology.(Oxford)*, 47 Suppl 5, v23-v24.
5. Adamson, I. Y. & Bowden, D. H. (1974). The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest.*, 30, 35-42.
6. Adamson, I. Y. & Bowden, D. H. (1975). Derivation of type 1 epithelium from type 2 cells in the developing rat lung. *Lab Invest.*, 32, 736-745.
7. Ahrens, I. & Peter, K. (2009). FX-06, a fibrin-derived Bbeta15-42 peptide for the potential treatment of reperfusion injury following myocardial infarction. *Curr.Opin.Investig.Drugs*, 10, 997-1003.
8. Aicher, A., Heeschen, C., Mildner-Rihm, C., Urbich, C., Ihling, C., Technau-Ihling, K. et al. (2003). Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.*, 9, 1370-1376.
9. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). The adaptive immune system. In *The molecular biology of the cell* (4 ed., pp. 1363-1422). Garland Science, New York, USA.
10. Albrektsson, T. & Albrektsson, B. (1978). Microcirculation in grafted bone. A chamber technique for vital microscopy of rabbit bone transplants. *Acta Orthop.Scand.*, 49, 1-7.
11. Alexandrakis, G., Brown, E. B., Tong, R. T., McKee, T. D., Campbell, R. B., Boucher, Y. et al. (2004). Two-photon fluorescence correlation microscopy reveals the two-phase nature of transport in tumors. *Nat.Med.*, 10, 203-207.
12. Ali, N. N., Edgar, A. J., Samadikuchaksaraei, A., Timson, C. M., Romanska, H. M., Polak, J. M. et al. (2002). Derivation of type II alveolar epithelial cells from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng.*, 8, 541-550.
13. Amo, Y., Masuzawa, M., Hamada, Y., & Katsuoka, K. (2004). Serum concentrations of vascular endothelial growth factor-D in angiosarcoma patients. *Br.J Dermatol.*, 150, 160-161.

14. Anversa, P., Leri, A., & Kajstura, J. (2006). Cardiac regeneration. *J Am.Coll.Cardiol.*, 47, 1769-1776.
15. Arfors, K. E., Jonsson, J. A., & McKenzie, F. N. (1970). A titanium rabbit ear chamber: assembly, insertion and results. *Microvasc.Res.*, 2, 516-518.
16. Asahara, T. & Isner, J. M. (2004). Endothelial progenitor cells. In S.Sell (Ed.), *Stem cells handbook* (pp. 221-227). Totowa, NJ (USA): Humana Press.
17. Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der, Z. R., Li, T. et al. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275, 964-967.
18. Asaishi, K., Endrich, B., Gotz, A., & Messmer, K. (1981). Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3. *Cancer Res.*, 41, 1898-1904.
19. Ashizawa, N., Graf, K., Do, Y. S., Nunohiro, T., Giachelli, C. M., Meehan, W. P. et al. (1996). Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction. *J Clin.Invest*, 98, 2218-2227.
20. Askari, A. T., Unzek, S., Popovic, Z. B., Goldman, C. K., Forudi, F., Kiedrowski, M. et al. (2003). Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*, 362, 697-703.
21. Assmus, B., Schachinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Dobert, N. et al. (2002). Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 106, 3009-3017.
22. Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, C. A., Miller, D. M., & Sporn, M. B. (1983). Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol.Chem.*, 258, 7155-7160.
23. Bachofen, M. & Weibel, E. R. (1977). Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev.Respir Dis.*, 116, 589-615.
24. Bajory, Z., Hutter, J., Krombach, F., & Messmer, K. (2002). New method: the intravital videomicroscopic characteristics of the microcirculation of the urinary bladder in rats. *Urol.Res.*, 30, 148-152.
25. Banda, M. J., Knighton, D. R., Hunt, T. K., & Werb, Z. (1982). Isolation of a nonmitogenic angiogenesis factor from wound fluid. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 79, 7773-7777.
26. Barker, J. H., Hammersen, F., Bondar, I., Uhl, E., Galla, T. J., Menger, M. D. et al. (1989). The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation. *Plast.Reconstr.Surg.*, 83, 948-959.

27. Barres, B. A., Hart, I. K., Coles, H. S., Burne, J. F., Voyvodic, J. T., Richardson, W. D. et al. (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, 70, 31-46.
28. Baumhueter, S., Dybdal, N., Kyle, C., & Lasky, L. A. (1994). Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood*, 84, 2554-2565.
29. Bazzoni, G. & Dejana, E. (2001). Pores in the sieve and channels in the wall: control of paracellular permeability by junctional proteins in endothelial cells. *Microcirculation.*, 8, 143-152.
30. BBC Gel 'to speed up wound healing'. *BBC*, (in press).
31. Beerepoot, L. V., Mehra, N., Vermaat, J. S., Zonnenberg, B. A., Gebbink, M. F., & Voest, E. E. (2004). Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients. *Ann.Oncol.*, 15, 139-145.
32. Beger, C., Cirulli, V., Vajkoczy, P., Halban, P. A., & Menger, M. D. (1998). Vascularization of purified pancreatic islet-like cell aggregates (pseudoislets) after syngeneic transplantation. *Diabetes*, 47, 559-565.
33. Beger, C. & Menger, M. D. (1997). RS-61443 prevents microvascular rejection of pancreatic islet xenografts. *Transplantation*, 63, 577-582.
34. Benny, O., Fainaru, O., Adini, A., Cassiola, F., Bazinet, L., Adini, I. et al. (2008). An orally delivered small-molecule formulation with antiangiogenic and anticancer activity. *Nat.Biotechnol.*, 26, 799-807.
35. Bernard, G. R., Artigas, A., Drighan, D. L., Carlet, J., Falke, K., Hudson, L. et al. (1994). The American-European consensus on ARDS: Definition, mechanisms, relevant outcome, and clinical trial coordination. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 149, 818-824.
36. Berse, B., Brown, L. F., Van de, W. L., Dvorak, H. F., & Senger, D. R. (1992). Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol.Biol.Cell*, 3, 211-220.
37. Bersinger, N. A., Gunthert, A. R., McKinnon, B., Johann, S., & Mueller, M. D. (2010). Dose-response effect of interleukin (IL)-1beta, tumour necrosis factor (TNF)-alpha, and interferon-gamma on the in vitro production of epithelial neutrophil activating peptide-78 (ENA-78), IL-8, and IL-6 by human endometrial stromal cells. *Arch.Gynecol.Obstet.*
38. Bikfalvi, A. (2007). [Tumor angiogenesis]. *Bull.Cancer*, 94, F193-F198.
39. Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C., & Vescovi, A. L. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*, 283, 534-537.
40. Blaber, M., DiSalvo, J., & Thomas, K. A. (1996). X-ray crystal structure of human acidic fibroblast growth factor. *Biochemistry*, 35, 2086-2094.

41. Blann, A. D., Woywodt, A., Bertolini, F., Bull, T. M., Buyon, J. P., Clancy, R. M. et al. (2005). Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb.Haemost.*, 93, 228-235.
42. Blau, H. M., Brazelton, T. R., & Weimann, J. M. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell.*, 105, 829-841.
43. Boers, J. E., Ambergen, A. W., & Thunnissen, F. B. (1998). Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med.*, 157, 2000-2006.
44. Bogers, A. J., Gittenberger-de Groot, A. C., Poelmann, R. E., Peault, B. M., & Huysmans, H. A. (1989). Development of the origin of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth? *Anat Embryol.(Berl)*, 180, 437-441.
45. Bompais, H., Chagraoui, J., Canron, X., Crisan, M., Liu, X. H., Anjo, A. et al. (2004). Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties as compared to mature vessel wall endothelial cells. *Blood*, 103, 2577-2584.
46. Bonaros, N., Rauf, R., Werner, E., Schlechta, B., Rohde, E., Kocher, A. et al. (2008). Neoangiogenesis after combined transplantation of skeletal myoblasts and angiopoietic progenitors leads to increased cell engraftment and lower apoptosis rates in ischemic heart failure. *Interact.Cardiovasc.Thorac.Surg*, 7, 249-255.
47. Borgstrom, P., Hillan, K. J., Sriramaraio, P., & Ferrara, N. (1996). Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Res.*, 56, 4032-4039.
48. Borthwick, D. W., Shahbazian, M., Todd Krantz, Q., Dorin, J. R., & Randell, S. H. (2001). Evidence for Stem-Cell Niches in the Tracheal Epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24, 662-670.
49. Brew, K., Dinakarbandian, D., & Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim.Biophys.Acta*, 1477, 267-283.
50. Britten, M. B., Abolmaali, N. D., Assmus, B., Lehmann, R., Honold, J., Schmitt, J. et al. (2003). Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*, 108, 2212-2218.
51. Broide, D. & Sriramaraio, P. (2001). Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. *Immunol.Rev.*, 179, 163-172.
52. Bull, T. M., Golpon, H., Hebbel, R. P., Solovey, A., Cool, C. D., Tudor, R. M. et al. (2003). Circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Thromb.Haemost.*, 90, 698-703.

53. Burnham, E. & Moss, M. (2006). Progenitor cells in acute lung injury. *Minerva Anesthesiol.*, 72, 369-374.
54. Burnham, E. L., Taylor, W. R., Quyyumi, A. A., Rojas, M., Brigham, K. L., & Moss, M. (2005). Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury. *Am.J Respir Crit Care Med*, 172, 854-860.
55. Burton, K. S. & Johnson, P. C. (1972). Reactive hyperemia in individual capillaries of skeletal muscle. *Am.J.Physiol*, 223, 517-524.
56. Butcher, E. C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 67, 1033-1036.
57. Cai, K. X., Tse, L. Y., Leung, C., Tam, P. K., Xu, R., & Sham, M. H. (2008). Suppression of lung tumor growth and metastasis in mice by adeno-associated virus-mediated expression of vasostatin. *Clin.Cancer Res.*, 14, 939-949.
58. Cao, Y., Ji, R. W., Davidson, D., Schaller, J., Marti, D., Sohndel, S. et al. (1996). Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol.Chem.*, 271, 29461-29467.
59. Carlos, T. M. & Harlan, J. M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, 84, 2068-2101.
60. Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat.Med.*, 9, 653-660.
61. Chavakis, E., Aicher, A., Heeschen, C., Sasaki, K., Kaiser, R., El Makhfi, N. et al. (2005). Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp.Med*, 201, 63-72.
62. Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J. C., & Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.*, 125, 725-732.
63. Choi, S. T., Kim, J. H., Kang, E. J., Lee, S. W., Park, M. C., Park, Y. B. et al. (2008). Osteopontin might be involved in bone remodelling rather than in inflammation in ankylosing spondylitis. *Rheumatology.(Oxford)*, 47, 1775-1779.
64. Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C., Mallowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A. et al. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, 120, 421-433.
65. Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M. C., & Martinez, D. L. E. (2009). Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev.*, 89, 1177-1215.
66. Clark E.R., Kirby-Smith H.A.T, Rex R.O., & Williams R.G. (1930). Recent modifications in the method of studying living cells and tissues in transparent chambers inserted in the rabbit's ear. *Anat.Rec.*, 47, 187-211.

67. Coffin, J. D. & Poole, T. J. (1991). Endothelial cell origin and migration in embryonic heart and cranial blood vessel development. *Anat Rec.*, 231, 383-395.
68. Coraux, C., Nawrocki-Raby, B., Hinnrasky, J., Kileztky, C., Gaillard, D., Dani, C. et al. (2005). Embryonic stem cells generate airway epithelial tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 32, 87-92.
69. Corboz, M. R., Ballard, S. T., Boyette, S. T., & Taylor, A. E. (1995). Distribution of functional adrenergic receptor subtypes in the microcirculation of rat trachea. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 151, 1589-1596.
70. Corboz, M. R., Ballard, S. T., Inglis, S. K., & Taylor, A. E. (1996). Tracheal microvascular responses to beta-adrenergic stimulation in anesthetized rats. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 153, 1093-1097.
71. Corboz, M. R., Ballard, S. T., Inglis, S. K., & Taylor, A. E. (1997). Dilatory effect of furosemide on rat tracheal arterioles and venules. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 156, 478-483.
72. Crosby, J. R., Kaminski, W. E., Schatteman, G., Martin, P. J., Raines, E. W., Seifert, R. A. et al. (2000a). Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ.Res.*, 87, 728-730.
73. Crosby, J. R., Kaminski, W. E., Schatteman, G., Martin, P. J., Raines, E. W., Seifert, R. A. et al. (2000b). Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ.Res.*, 87, 728-730.
74. Cui, R., Takahashi, F., Ohashi, R., Gu, T., Yoshioka, M., Nishio, K. et al. (2007). Abrogation of the interaction between osteopontin and alphavbeta3 integrin reduces tumor growth of human lung cancer cells in mice. *Lung Cancer*, 57, 302-310.
75. Da Silva, A. P., Pollett, A., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., Sodek, J., & Zohar, R. (2006). Exacerbated tissue destruction in DSS-induced acute colitis of OPN-null mice is associated with downregulation of TNF-alpha expression and non-programmed cell death. *J Cell Physiol*, 208, 629-639.
76. Danto, S. I., Shannon, J. M., Borok, Z., Zabski, S. M., & Crandall, E. D. (1995). Reversible transdifferentiation of alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 12, 497-502.
77. Davis, M. J., Gilmore, J. P., & Joyner, W. L. (1981). Responses of pulmonary allograft and cheek pouch arterioles in the hamster to alterations in extravascular pressure in different oxygen environments. *Circ.Res.*, 49, 133-140.
78. Davis, M. J., Joyner, W. L., & Gilmore, J. P. (1981). Microvascular pressure distribution and responses of pulmonary allografts and cheek pouch arterioles in the hamster to oxygen. *Circ.Res.*, 49, 125-132.

79. de Boer, H. C., Verseyden, C., Ulfman, L. H., Zwaginga, J. J., Bot, I., Biessen, E. A. et al. (2006). Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 26, 1653-1659.
80. De Palma, M., Venneri, M. A., Roca, C., & Naldini, L. (2003). Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat.Med.*, 9, 789-795.
81. DeLisser, H. M., Newman, P. J., & Albelda, S. M. (1994). Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol.Today*, 15, 490-495.
82. Denekamp J. (1984). Vasculature as a target for tumour therapy. *Prog Appl Microcirc*, 4, 28-38.
83. Denhardt, D. T., Noda, M., O'Regan, A. W., Pavlin, D., & Berman, J. S. (2001). Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin.Invest*, 107, 1055-1061.
84. Derynck, R., Jarrett, J. A., Chen, E. Y., Eaton, D. H., Bell, J. R., Assoian, R. K. et al. (1985). Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature*, 316, 701-705.
85. Dieterlen-Lievre, F. (1987). Hemopoietic cell progenitors in the avian embryo: origin and migrations. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 511, 77-87.
86. Ding, Y. H., Luan, X. D., Li, J., Rafols, J. A., Guthinkonda, M., Diaz, F. G. et al. (2004). Exercise-induced overexpression of angiogenic factors and reduction of ischemia/reperfusion injury in stroke. *Curr.Neurovasc.Res.*, 1, 411-420.
87. Doerschuk, C. M., Beyers, N., Coxson, H. O., Wiggs, B., & Hogg, J. C. (1993). Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung. *J.Appl.Physiol*, 74, 3040-3045.
88. Donovan, P. J. & Gearhart, J. (2001a). The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, 414, 92-97.
89. Donovan, P. J. & Gearhart, J. (2001b). The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, 414, 92-97.
90. Du, X. L., Jiang, T., Sheng, X. G., Gao, R., & Li, Q. S. (2009). Inhibition of osteopontin suppresses in vitro and in vivo angiogenesis in endometrial cancer. *Gynecol.Oncol.*, 115, 371-376.
91. Duan, D., Sehgal, A., Yao, J., & Engelhardt, J. F. (1998). Lef1 Transcription Factor Expression Defines Airway Progenitor Cell Targets for In Utero Gene Therapy of Submucosal Gland in Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 18, 750-758.
92. Duan, H., Cheng, L., Sun, X., Wu, Y., Hu, L., Wang, J. et al. (2006). LFA-1 and VLA-4 involved in human high proliferative potential-

endothelial progenitor cells homing to ischemic tissue. *Thromb Haemost.*, 96, 807-815.

93. Duling, B. R. (1973). The preparation and use of the hamster cheek pouch for studies of the microcirculation. *Microvasc.Res.*, 5, 423-429.
94. Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N.Engl.J Med.*, 315, 1650-1659.
95. Eglitis, M. A. & Mezey, E. (1997). Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4080-4085.
96. Eisman, R., Surrey, S., Ramachandran, B., Schwartz, E., & Poncz, M. (1990). Structural and functional comparison of the genes for human platelet factor 4 and PF4alt. *Blood*, 76, 336-344.
97. Endrich, B., Asaishi, K., Gotz, A., & Messmer, K. (1980). Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res.Exp.Med.(Berl)*, 177, 125-134.
98. Endrich, B., Hammersen, F., Gotz, A., & Messmer, K. (1982). Microcirculatory blood flow, capillary morphology and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma A-Mel-3. *J Natl.Cancer Inst.*, 68, 475-485.
99. Engelhardt, J. F., Schlossberg, H., Yankaskas, J. R., & Dudus, L. (1995). Progenitor cells of the adult human airway involved in submucosal gland development. *Development.*, 121, 2031-2046.
100. Epperly, M. W., Guo, H., Gretton, J. E., & Greenberger, J. S. (2003). Bone marrow origin of myofibroblasts in irradiation pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 29, 213-224.
101. Espinosa-Heidmann, D. G., Caicedo, A., Hernandez, E. P., Csaky, K. G., & Cousins, S. W. (2003). Bone marrow-derived progenitor cells contribute to experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol. Vis.Sci*, 44, 4914-4919.
102. Evans, M. J., Cabral, L. J., Stephens, R. J., & Freeman, G. (1975). Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp Mol Pathol.*, 22, 142-150.
103. Farina, H. G., Pomies, M., Alonso, D. F., & Gomez, D. E. (2006). Anti-tumor and antiangiogenic activity of soy isoflavone genistein in mouse models of melanoma and breast cancer. *Oncol.Rep.*, 16, 885-891.
104. Fehrenbach, H., Schmiedl, A., Wahlers, T., Hirt, S. W., Brasch, F., Riemann, D. et al. (1995). Morphometric characterisation of the fine structure of human type II pneumocytes. *Anat.Rec.*, 243, 49-62.
105. Feinberg, R. N. & Noden, D. M. (1991). Experimental analysis of blood vessel development in the avian wing bud. *Anat Rec.*, 231, 136-144.

106. Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. et al. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 279, 1528-1530.
107. Ferrari, G., Pintucci, G., Seghezzi, G., Hyman, K., Galloway, A. C., & Mignatti, P. (2006). VEGF, a prosurvival factor, acts in concert with TGF-beta1 to induce endothelial cell apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, 103, 17260-17265.
108. Fiebig, E., Ley, K., & Arfors, K. E. (1991a). Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.*, 10, 127-144.
109. Fiebig, E., Ley, K., & Arfors, K. E. (1991b). Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int.J Microcirc Clin.Exp.*, 10, 127-144.
110. Foitzick, T., Funk, W., Roth, H., & Messmer, K. (1988). Splenic implants: influence of particle size and fibrin fixation on vascularization and angioarchitecture. *Pediatr Surg Int*, 4, 263-268.
111. Folkman, J. (1985). Tumor angiogenesis. *Adv.Cancer Res.*, 43, 175-203.
112. Folkman, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl.Cancer Inst.*, 82, 4-6.
113. Folkman, J. (1995b). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat.Med.*, 1, 27-31.
114. Folkman, J. (1995a). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat.Med*, 1, 27-31.
115. Folkman, J. (1998). Angiogenic therapy of the human heart. *Circulation*, 97, 628-629.
116. Folkman, J. (2006). Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp.Cell Res.*, 312, 594-607.
117. Folkman, J. & Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science*, 235, 442-447.
118. Folkman, J. & Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J Biol.Chem.*, 267, 10931-10934.
119. Fontanini, G. (2000). Angiogenesis and Cancer. *Surg Technol.Int*, IX, 25-32.
120. Fortmeyer, H. P. (1981). Thymusaplastische Maus- (nu/nu) Thymusaplastische Ratte (rnu/rnu)- Haltung, Zucht, Versuchsmodelle. *Schriftenreihe Versuchstierkunde*.
121. Fortmeyer, H. P. and Bastert, G. (1977). Breeding and Keeping of nu/nu mice. *Z.Versuchstierk.*

122. Franke, N. & Endrich, B. (1983). [Effects of halothane and enflurane on the microcirculation]. *Anasth.Intensivther.Notfallmed.*, 18, 285-290.
123. Franke, N., Endrich, B., Laubenthal, H., Peter, K., & Messmer, K. (1982). [The effect of pentobarbital on the microcirculation of skeletal muscles and the subcutis. An animal-experimental study]. *Anasth.Intensivther.Notfallmed.*, 17, 11-14.
124. Fujita, M., Kuwano, K., Kunitake, R., Hagimoto, N., Miyazaki, H., Kaneko, Y. et al. (1998). Endothelial cell apoptosis in lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Int Arch Allergy Immunol.*, 117, 202-208.
125. Fujiyama, S., Amano, K., Uehira, K., Yoshida, M., Nishiwaki, Y., Nozawa, Y. et al. (2003). Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ.Res.*, 93, 980-989.
126. Funk, W., Endrich, B., & Messmer, K. (1986). A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. *Res.Exp.Med.(Berl)*, 186, 259-270.
127. Furstenberger, G., von, M. R., Lucas, R., Thurlimann, B., Senn, H. J., Hamacher, J. et al. (2006). Circulating endothelial cells and angiogenic serum factors during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer. *Br.J Cancer*, 94, 524-531.
128. Garcia-Barros, M., Paris, F., Cordon-Cardo, C., Lyden, D., Rafii, S., Haimovitz-Friedman, A. et al. (2003). Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*, 300, 1155-1159.
129. Gavin, T. P., Robinson, C. B., Yeager, R. C., England, J. A., Nifong, L. W., & Hickner, R. C. (2004). Angiogenic growth factor response to acute systemic exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 96, 19-24.
130. Gebb, S. A., Graham, J. A., Hanger, C. C., Godbey, P. S., Capen, R. L., Doerschuk, C. M. et al. (1995). Sites of leukocyte sequestration in the pulmonary microcirculation. *J Appl Physiol*, 79, 493-497.
131. Gerstberger, R., Meyer, J. U., Rettig, R., Printz, M., & Intaglietta, M. (1988). Regulatory role of vasoactive peptides in subcutaneous skin microcirculation of the hamster. *Int J Microcirc Clin.Exp.*, 7, 3-14.
132. Ghadami, M., Makita, Y., Yoshida, K., Nishimura, G., Fukushima, Y., Wakui, K. et al. (2000). Genetic mapping of the Camurati-Engelmann disease locus to chromosome 19q13.1-q13.3. *Am J Hum.Genet.*, 66, 143-147.
133. Giangreco, A., Shen, H., Reynolds, S. D., & Stripp, B. R. (2003). Molecular Phenotype of Airway Side Population Cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol.Physiol.*
134. Gilbert S.F. (2000). Endoderm. In *Developmental Biology* (6 ed., Sinauer.

-
135. Gilbert, K. M., Thoman, M., Bauche, K., Pham, T., & Weigle, W. O. (1997). Transforming growth factor-beta 1 induces antigen-specific unresponsiveness in naive T cells. *Immunol.Invest*, 26, 459-472.
 136. Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M. L., Hicklin, D., Witte, L. et al. (2001a). Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ.Res.*, 88, 167-174.
 137. Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M. L., Hicklin, D., Witte, L. et al. (2001b). Vascular Trauma Induces Rapid but Transient Mobilization of VEGFR2+AC133+ Endothelial Precursor Cells. *Circulation Research*, 88, 167-174.
 138. Gneccchi, M., He, H., Liang, O. D., Melo, L. G., Morello, F., Mu, H. et al. (2005). Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.*, 11, 367-368.
 139. Gneccchi, M., He, H., Noiseux, N., Liang, O. D., Zhang, L., Morello, F. et al. (2006). Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *The FASEB Journal*, 20, 661-669.
 140. Gomperts, B. N. & Strieter, R. M. (2006). Stem Cells and Chronic Lung Disease. *Annu.Rev.Med.*, ..
 141. Gonzalez, A. P., Sepulveda, S., Massberg, S., Baumeister, R., & Menger, M. D. (1994). In vivo fluorescence microscopy for the assessment of microvascular reperfusion injury in small bowel transplants in rats. *Transplantation*, 58, 403-408.
 142. Grandi, F., Sandal, M., Guarguaglini, G., Capriotti, E., Casadio, R., & Samori, B. (2006). Hierarchical mechanochemical switches in angiotensin. *Chembiochem.*, 7, 1774-1782.
 143. Grant, M. B., May, W. S., Caballero, S., Brown, G. A., Guthrie, S. M., Mames, R. N. et al. (2002). Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med.*, 8, 607-612.
 144. Greenblatt, M. & Shubi, P. (1968). Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl.Cancer Inst.*, 41, 111-124.
 145. Greenburg, G. B. & Hunt, T. K. (1978). The proliferative response in vitro of vascular endothelial and smooth muscle cells exposed to wound fluids and macrophages. *J Cell Physiol*, 97, 353-360.
 146. Greene, A. K., Alwayn, I. P., Nose, V., Flynn, E., Sampson, D., Zurawski, D. et al. (2005). Prevention of intra-abdominal adhesions using the antiangiogenic COX-2 inhibitor celecoxib. *Ann.Surg.*, 242, 140-146.
 147. Greer, R. (2010a). The temporal evolution of acute respiratory distress syndrome following shock. *Eur.J Anaesthesiol.*, 27, 226-232.

-
148. Greer, R. (2010b). The temporal evolution of acute respiratory distress syndrome following shock. *Eur.J Anaesthesiol.*, 27, 226-232.
 149. Guba, M., Yezhelyev, M., Eichhorn, M. E., Schmid, G., Ischenko, I., Papyan, A. et al. (2005). Rapamycin induces tumor-specific thrombosis via tissue factor in the presence of VEGF. *Blood*, 105, 4463-4469.
 150. Gunsilius, E., Gastl, G., & Petzer, A. L. (2001). Hematopoietic stem cells. *Biomed.Pharmacother.*, 55, 186-194.
 151. Haas, T. L., Milkiewicz, M., Davis, S. J., Zhou, A. L., Egginton, S., Brown, M. D. et al. (2000). Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ.Physiol*, 279, H1540-H1547.
 152. Hamacher, J. (2007). *Molekulare und zelluläre Therapieansätze zur Behandlung der pulmonalen endothelialen und epithelialen Dysfunktion*. Aus der Klinik für Innere Medizin V Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes.
 153. Hanger, C. C., Wagner, W. W., Jr., Janke, S. J., Lloyd, T. C., Jr., & Capen, R. L. (1993). Computer simulation of neutrophil transit through the pulmonary capillary bed. *J.Appl.Physiol*, 74, 1647-1652.
 154. Harder, Y., Amon, M., Erni, D., & Menger, M. D. (2004). Evolution of ischemic tissue injury in a random pattern flap: a new mouse model using intravital microscopy. *J Surg.Res.*, 121, 197-205.
 155. Harder, Y., Amon, M., Georgi, M., Banic, A., Erni, D., & Menger, M. D. (2005a). Evolution of a "falx lunatica" in demarcation of critically ischemic myocutaneous tissue. *Am J Physiol Heart Circ.Physiol*, 288, H1224-H1232.
 156. Harder, Y., Amon, M., Schramm, R., Georgi, M., Banic, A., Erni, D. et al. (2005b). Heat shock preconditioning reduces ischemic tissue necrosis by heat shock protein (HSP)-32-mediated improvement of the microcirculation rather than induction of ischemic tolerance. *Ann.Surg.*, 242, 869-78, discussion.
 157. Haviv, F., Bradley, M. F., Calvin, D. M., Schneider, A. J., Davidson, D. J., Majest, S. M. et al. (2005). Thrombospondin-1 mimetic peptide inhibitors of angiogenesis and tumor growth: design, synthesis, and optimization of pharmacokinetics and biological activities. *J Med.Chem.*, 48, 2838-2846.
 158. Heeschen, C., Lehmann, R., Honold, J., Assmus, B., Aicher, A., Walter, D. H. et al. (2004). Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation.*, 109, 1615-1622.
 159. Hehlhans, T. & Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115, 1-20.

160. Heidaran, M. A., Pierce, J. H., Jensen, R. A., Matsui, T., & Aaronson, S. A. (1990). Chimeric alpha- and beta-platelet-derived growth factor (PDGF) receptors define three immunoglobulin-like domains of the alpha-PDGF receptor that determine PDGF-AA binding specificity. *J Biol.Chem.*, 265, 18741-18744.
161. Heidaran, M. A., Pierce, J. H., Yu, J. C., Lombardi, D., Artrip, J. E., Fleming, T. P. et al. (1991). Role of alpha beta receptor heterodimer formation in beta platelet-derived growth factor (PDGF) receptor activation by PDGF-AB. *J Biol.Chem.*, 266, 20232-20237.
162. Heisig, N. (1968). Functional analysis of the microcirculation in the exocrine pancreas. *Adv Microcirc*, 1, 89-94.
163. Heiss, C., Keymel, S., Niesler, U., Ziemann, J., Kelm, M., & Kalka, C. (2005). Impaired Progenitor Cell Activity in Age-Related Endothelial Dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*, 45, 1441-1448.
164. Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N. R. et al. (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*, 109, 625-637.
165. Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M., & Jain, R. K. (1997). Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat.Med.*, 3, 177-182.
166. Henke, C., Fiegel, V., Peterson, M., Wick, M., Knighton, D., McCarthy, J. et al. (1991). Identification and partial characterization of angiogenesis bioactivity in the lower respiratory tract after acute lung injury. *J Clin.Invest*, 88, 1386-1395.
167. Heuser, M., Ringert, R. H., Zoeller, G., & Hemmerlein, B. (2003). Dynamic assessment of angiogenesis in renal cell carcinoma spheroids by intravital microscopy. *J Urol.*, 169, 1267-1270.
168. Heuser, M., Wolf, B., Vollmar, B., & Menger, M. D. (2000). Exocrine contamination of isolated islets of Langerhans deteriorates the process of revascularization after free transplantation. *Transplantation*, 69, 756-761.
169. Heyder, S., Regelin, N., Laschke, M., Sybrecht, G., Menger, M. D., & Hamacher, J. (2006). Implantation von Lungengewebe in die Rücken-hautkammer der Maus als Modell zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der pulmonalen Mikrozirkulation. In Nürnberg.
170. Hill, J. M., Zalos, G., Halcox, J. P., Schenke, W. H., Waclawiw, M. A., Quyyumi, A. A. et al. (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N.Engl.J.Med.*, 348, 593-600.
171. Hillebrands, J. L., Klatter, F. A., van den Hurk, B. M., Popa, E. R., Nieuwenhuis, P., & Rozing, J. (2001). Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest*, 107, 1411-1422.

172. His W. (1900). Lecithoblast und Angioblast der Wirbeltiere. *Abhandl K S Ges Wiss Math-Phys*, 22, 171-328.
173. Hobbs, J. B., Chusilp, S., Hua, A., Kincaid-Smith, P., & McIver, M. A. (1976). The pathogenesis of hypertensive vascular changes in the rat: microscopic and ultrastructural correlation in vivo. *Clin.Sci.Mol.Med.Suppl*, 3, 73s-75s.
174. Hogg, J. C. (1987). Neutrophil kinetics and lung injury. *Physiological Reviews*, 67, 1249-1295.
175. Hogg, J. C. (1991). *Neutrophil kinetics in the pulmonary circulation. Pulmonary Circulation and Acute Injury*. (Said SI. Mount Kisco ed.) New York.
176. Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M., & Cross, M. J. (2007). Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal.*, 19, 2003-2012.
177. Hong, K. U., Reynolds, S. D., Watkins, S., Fuchs, E., & Stripp, B. R. (2004a). In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286, L643-L649.
178. Hong, K. U., Reynolds, S. D., Watkins, S., Fuchs, E., & Stripp, B. R. (2004b). Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol.*, 164, 577-588.
179. Hong, K. U., Reynolds, S. D., Watkins, S., Fuchs, E., & Stripp, B. R. (2004c). In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 286, L643-L649.
180. Horowitz, J. C., Cui, Z., Moore, T. A., Meier, T. R., Reddy, R. C., Toews, G. B. et al. (2006). Constitutive activation of prosurvival signaling in alveolar mesenchymal cells isolated from patients with nonresolving acute respiratory distress syndrome. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 290, L415-L425.
181. Hu, Y., Davison, F., Zhang, Z., & Xu, Q. (2003). Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation*, 108, 3122-3127.
182. Hudlicka O. (1984). Development of microcirculation: capillary growth and adaptation. *Handbook of Physiology Sect 2, IV*, 165-216.
183. Huwer, H., Nikoloudakis, N., Rissland, J., Vollmar, B., Menger, M. D., & Schafers, H. J. (1998). In vivo analysis of microvascular injury after myocardial cryothermia. *J.Surg.Res.*, 79, 1-7.
184. Huwer, H., Winning, J., Vollmar, B., Rissland, J., Welter, C., Schafers, H. J. et al. (2001). Microvascularization and ventricular function after local alginate-encapsulated angiogenic growth factor treatment in a rat cryothermia-induced myocardial infarction model. *Microvasc.Res.*, 62, 211-214.

185. Ikeda, T., Shirasawa, T., Esaki, Y., Yoshiki, S., & Hirokawa, K. (1993). Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta. *J Clin. Invest.*, 92, 2814-2820.
186. Imanishi, T., Hano, T., & Nishio, I. (2005a). Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens.*, 23, 97-104.
187. Imanishi, T., Hano, T., & Nishio, I. (2005b). Estrogen reduces angiotensin II-induced acceleration of senescence in endothelial progenitor cells. *Hypertens. Res.*, 28, 263-271.
188. Imanishi, T., Hano, T., Sawamura, T., & Nishio, I. (2004). Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 31, 407-413.
189. Imanishi, T., Moriwaki, C., Hano, T., & Nishio, I. (2005). Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *J Hypertens.*, 23, 1831-1837.
190. Intaglietta, M., Tompkins, W. R., & Richardson, D. R. (1970). Velocity measurements in the microvasculature of the cat omentum by on-line method. *Microvasc. Res.*, 2, 462-473.
191. Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W. et al. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin. Invest.*, 107, 1395-1402.
192. Jackson, K. A., Mi, T., & Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S A.*, 96, 14482-14486.
193. Jafri, S. H., Glass, J., Shi, R., Zhang, S., Prince, M., & Kleiner-Hancock, H. (2010). Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: In vitro and in vivo. *J Exp Clin. Cancer Res.*, 29, 87.
194. Jain, R. K. (1998). The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nat. Med.*, 4, 655-657.
195. Jain, R. K. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat. Med.*, 7, 987-989.
196. Jamur, M. C., Grodzki, A. C., Moreno, A. N., de Mello, L. F., Pastor, M. V., Berenstein, E. H. et al. (2001). Identification and isolation of rat bone marrow-derived mast cells using the mast cell-specific monoclonal antibody AA4. *J Histochem. Cytochem.*, 49, 219-228.
197. Jian, X., Li, M., Zhang, Y., Ruan, Y., Guo, G., Sui, H. et al. (2010). Role of growth factors in acute lung injury induced by paraquat in a rat model. *Hum. Exp. Toxicol.*
198. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R. et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 41-49.

199. Jin, D. K., Shido, K., Kopp, H. G., Petit, I., Shmelkov, S. V., Young, L. M. et al. (2006a). Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. *Nat Med.*, 12, 557-567.
200. Jin, H., Aiyer, A., Su, J., Borgstrom, P., Stupack, D., Friedlander, M. et al. (2006b). A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *J Clin Invest.*, 116, 652-662.
201. Jones, M. K., Wang, H., Peskar, B. M., Levin, E., Itani, R. M., Sarfeh, I. J. et al. (1999). Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat.Med.*, 5, 1418-1423.
202. Kabrun, N., Buhring, H. J., Choi, K., Ullrich, A., Risau, W., & Keller, G. (1997). Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development*, 124, 2039-2048.
203. Kahler, C. M., Wechselberger, J., Hilbe, W., Gschwendtner, A., Colleselli, D., Niederegger, H. et al. (2007). Peripheral infusion of rat bone marrow derived endothelial progenitor cells leads to homing in acute lung injury. *Respir Res.*, 8:50., 50.
204. Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Gordon, R., Tepper, O., Gravereaux, E. et al. (2000). Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ.Res.*, 86, 1198-1202.
205. Kalluri, R. & Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.*, 112, 1776-1784.
206. Kawamura, S., Schurer, L., Goetz, A., Kempinski, O., Schmucker, B., & Baethmann, A. (1990). An improved closed cranial window technique for investigation of blood-brain barrier function and cerebral vasomotor control in the rat. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.*, 9, 369-383.
207. Kawasaki, M., Kuwano, K., Hagimoto, N., Matsuba, T., Kunitake, R., Tanaka, T. et al. (2000). Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by a caspase inhibitor. *Am J Pathol.*, 157, 597-603.
208. Keeley, E. C., Mehrad, B., & Strieter, R. M. (2010). Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. *Exp Cell Res.*
209. Kelley, J. (1990). Cytokines of the lung. *Am Rev.Respir.Dis.*, 141, 765-788.
210. Kern, B. E., Balcom, J. H., Antoniu, B. A., Warshaw, A. L., & Fernandez-del Castillo, C. (2003). Troponin I peptide (Glu94-Leu123), a cartilage-derived angiogenesis inhibitor: in vitro and in vivo effects on human endothelial cells and on pancreatic cancer. *J Gastrointest.Surg.*, 7, 961-968.
211. Khakoo, A. Y. & Finkel, T. (2005). Endothelial progenitor cells. *Annu.Rev.Med.*, 56, 79-101.

-
212. Khalkhali-Ellis, Z. (2006). Maspin: the new frontier. *Clin.Cancer Res.*, 12, 7279-7283.
213. Khurana, R. & Simons, M. (2003). Insights from angiogenesis trials using fibroblast growth factor for advanced arteriosclerotic disease. *Trends Cardiovasc.Med.*, 13, 116-122.
214. Kim, C. F. B., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S. et al. (2005). Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung Cancer. *Cell*, 121, 823-835.
215. Kim, J. Y., Lee, K. H., Lee, B. K., & Ro, J. Y. (2005). Peroxynitrite modulates release of inflammatory mediators from guinea pig lung mast cells activated by antigen-antibody reaction. *Int Arch.Allergy Immunol.*, 137, 104-114.
216. Kitamura, Y., Hashimoto, S., Mizuta, N., Kobayashi, A., Kooguchi, K., Fujiwara, I. et al. (2001). Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 163, 762-769.
217. Klabunde, R. E. (2010). Cardiovascular Pharmacology Concepts. Ref Type: Internet Communication
218. Kotton, D. N., Ma, B. Y., Cardoso, W. V., Sanderson, E. A., Summer, R. S., Williams, M. C. et al. (2001). Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*, 128, 5181-5188.
219. Kotton, D. N., Fabian, A. J., & Mulligan, R. C. (2005). Failure of Bone Marrow to Reconstitute Lung Epithelium. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2005-0175RC.
220. Kowalska, M. A., Rauova, L., & Poncz, M. (2010). Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis. *Thromb.Res.*, 125, 292-296.
221. Kraft, C. N., Hansis, M., Arens, S., Menger, M. D., & Vollmar, B. (2000). Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *J Biomed.Mater.Res.*, 49, 192-199.
222. Kraus, R. M., Stallings, H. W., III, Yeager, R. C., & Gavin, T. P. (2004). Circulating plasma VEGF response to exercise in sedentary and endurance-trained men. *J Appl Physiol*, 96, 1445-1450.
223. Krause, D. S. (2002). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther*, 9, 754-758.
224. Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R. et al. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105, 369-377.
225. Kubo, H. (2005). Is cell therapy in acute lung injury a realistic dream? *Am J Respir Crit Care Med.*, 172, 794-795.

226. Kuebler, W. M., Kuhnle, G. E., Groh, J., & Goetz, A. E. (1994). Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J Appl Physiol.*, 76, 65-71.
227. Kuhnle, G. E., Leipfinger, F. H., & Goetz, A. E. (1993a). Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy. *J Appl Physiol*, 74, 1462-1471.
228. Kuhnle, G. E., Leipfinger, F. H., & Goetz, A. E. (1993b). Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy. *J Appl Physiol*, 74, 1462-1471.
229. Kuki, S., Imanishi, T., Kobayashi, K., Matsuo, Y., Obana, M., & Akasaka, T. (2006). Hyperglycemia accelerated endothelial progenitor cell senescence via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Circ J.*, 70, 1076-1081.
230. Kurz, H., Gartner, T., Eggli, P. S., & Christ, B. (1996). First blood vessels in the avian neural tube are formed by a combination of dorsal angioblast immigration and ventral sprouting of endothelial cells. *Dev.Biol.*, 173, 133-147.
231. Labastie, M. C., Poole, T. J., Peault, B. M., & Le Douarin, N. M. (1986). MB1, a quail leukocyte-endothelium antigen: partial characterization of the cell surface and secreted forms in cultured endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, 83, 9016-9020.
232. Laflamme, M. A. & Murry, C. E. (2005). Regenerating the heart. *Nat Biotechnol.*, 23, 845-856.
233. Lagasse, E., Connors, H., Al Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L. et al. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat.Med.*, 6, 1229-1234.
234. Langer, H., May, A. E., Daub, K., Heinzmann, U., Lang, P., Schumm, M. et al. (2006). Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. *Circ Res.*, 98, e2-10.
235. Laschke, M. W., Elitzsch, A., Vollmar, B., & Menger, M. D. (2005). In vivo analysis of angiogenesis in endometriosis-like lesions by intravital fluorescence microscopy. *Fertil.Steril.*, 84 Suppl 2, 1199-1209.
236. Laschke, M. W., Elitzsch, A., Vollmar, B., Vajkoczy, P., & Menger, M. D. (2006). Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum.Reprod.*, 21, 262-268.
237. Laufs, U., Urhausen, A., Werner, N., Scharhag, J., Heitz, A., Kissner, G. et al. (2005). Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardio-vasc.Prev.Rehabil.*, 12, 407-414.

238. Laufs, U., Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jurgens, K. et al. (2004). Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation.*, 109, 220-226.
239. Lebman, D. A. & Edmiston, J. S. (1999). The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes.Infect.*, 1, 1297-1304.
240. Lee, M. J., Kim, J., Lee, K. I., Shin, J. M., Chae, J. I., & Chung, H. M. (2011). Enhancement of wound healing by secretory factors of endothelial precursor cells derived from human embryonic stem cells. *Cytherapy.*, 13, 165-178.
241. Lee, S. H., Wolf, P. L., Escudero, R., Deutsch, R., Jamieson, S. W., & Thistlethwaite, P. A. (2000). Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N.Engl.J Med.*, 342, 626-633.
242. Lehr, H. A., Leunig, M., Menger, M. D., Nolte, D., & Messmer, K. (1993). Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol.*, 143, 1055-1062.
243. Letterio, J. J. & Roberts, A. B. (1998b). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu.Rev.Immunol.*, 16, 137-161.
244. Letterio, J. J. & Roberts, A. B. (1998a). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu.Rev.Immunol.*, 16, 137-161.
245. Leunig, M., Yuan, F., Menger, M. D., Boucher, Y., Goetz, A. E., Messmer, K. et al. (1992). Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res.*, 52, 6553-6560.
246. Leutz, M. & Sybrecht, G. W. (1999). Intensivmedizin. In *Thiemes Innere Medizin* (Stuttgart, New York: Thieme.
247. Li, T., Zhou, J., Deng, Z., Fu, C., Jiang, H., Gao, Z. et al. (2009). [Expression of FGF-2 and osteopontin in non-small cell lung cancer]. *Zhong.Nan.Da.Xue.Xue.Bao.Yi.Xue.Ban.*, 34, 1114-1119.
248. Liang, L. & Bickenbach, J. R. (2002). Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. *Stem Cells.*, 20, 21-31.
249. Lien, D. C., Wagner, W. W., Capen, R. L., Haslett, C., Hanson, W. L., Hofmeister, S. E. et al. (1987a). Physiological neutrophil sequestration in the lung: visual evidence for localization in capillaries. *J.Appl.Physiol.*, 62, 1236-1243.
250. Lien, D. C., Wagner, W. W., Jr., Capen, R. L., Haslett, C., Hanson, W. L., Hofmeister, S. E. et al. (1987b). Physiological neutrophil sequestration in the lung: visual evidence for localization in capillaries. *J Appl Physiol*, 62, 1236-1243.

251. Lien, D. C., Worthen, G. S., Capen, R. L., Hanson, W. L., Checkley, L. L., Janke, S. J. et al. (1990). Neutrophil kinetics in the pulmonary micro-circulation. Effects of pressure and flow in the dependent lung. *Am Rev.Respir.Dis.*, 141, 953-959.
252. Lin, Y., Weisdorf, D. J., Solovey, A., & Hebbel, R. P. (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J.Clin.Invest*, 105, 71-77.
253. Lin, Y. M., Zhang, A., Bismarck, A., & Bishop, A. E. (2010). Effects of fibroblast growth factors on the differentiation of the pulmonary progenitors from murine embryonic stem cells. *Exp.Lung Res.*, 36, 307-320.
254. Lindsay, C. D. (2010). Novel therapeutic strategies for acute lung injury induced by lung damaging agents: The potential role of growth factors as treatment options. *Hum.Exp.Toxicol.*
255. Liu, E., Morimoto, M., Kitajima, S., Koike, T., Yu, Y., Shiiki, H. et al. (2007). Increased expression of vascular endothelial growth factor in kidney leads to progressive impairment of glomerular functions. *J Am Soc Nephrol.*, 18, 2094-2104.
256. Liu, N., Lapcevic, R. K., Underhill, C. B., Han, Z., Gao, F., Swartz, G. et al. (2001). Metastatin: a hyaluronan-binding complex from cartilage that inhibits tumor growth. *Cancer Res.*, 61, 1022-1028.
257. Liu, Z., Schwimer, J., Liu, D., Greenway, F. L., Anthony, C. T., & Woltering, E. A. (2005). Black raspberry extract and fractions contain angiogenesis inhibitors. *J Agric.Food Chem.*, 53, 3909-3915.
258. Llevadot, J., Murasawa, S., Kureishi, Y., Uchida, S., Masuda, H., Kawamoto, A. et al. (2001). HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *J Clin.Invest*, 108, 399-405.
259. Lloyd, P. G., Prior, B. M., Yang, H. T., & Terjung, R. L. (2003). Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *Am J Physiol Heart Circ.Physiol*, 284, H1668-H1678.
260. Lobov, I. B., Renard, R. A., Papadopoulos, N., Gale, N. W., Thurston, G., Yancopoulos, G. D. et al. (2007). Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, 104, 3219-3224.
261. Luhr, O. R., Antonsen, K., Karlsson, M., Aardal, S., Thronsteinsson, A., & Frostell, C. G. (1999). Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark and Iceland. *Am J Respir Crit Care Med*, 159, 1849-1861.
262. Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L. et al. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat.Med.*, 7, 1194-1201.

263. Ma, Z. C., Lou, L. G., Zhang, Z., & Xu, B. (2000). Antiangiogenic effect of alpha-anordrin in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol.Sin.*, 21, 939-944.
264. Macchiarini, P., Fontanini, G., Hardin, M. J., Squartini, F., & Angeletti, C. A. (1992). Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet*, 340, 145-146.
265. Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K. D., & Tatusova, T. (2007). Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res.*, 35, D26-D31.
266. Mailänder, V., Rojewski, M., Burkhardt, J., Körper, S., & Schrezenmeier, H. (2005). Adulte Stammzellen: Hoffnung für die regenerative Medizin. *Hämotherapie*, 4, 4-21.
267. Mancuso, P., Burlini, A., Pruneri, G., Goldhirsch, A., Martinelli, G., & Bertolini, F. (2001). Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood*, 97, 3658-3661.
268. Mapp, P. I. & Walsh, D. A. (2008). Neurogenic angiogenesis and inflammation. In M.J.Parnham (Ed.), *Angiogenesis in Inflammation: Mechanisms and Clinical Correlates* (pp. 1-14). Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser.
269. Marshall, B. E., Marshall, C., Benumof, J., & Saidman, L. J. (1981). Hypoxic pulmonary vasoconstriction in dogs: effects of lung segment size and oxygen tension. *J Appl Physiol*, 51, 1543-1551.
270. Marti H. (2000). Pleiotropic Action of VEGF in the CNS. In *Vascular Endothelial Growth Factor* (Landes Bioscience.
271. Martin, B. A., Wiggs, B. R., Lee, S., & Hogg, J. C. (1987a). Regional differences in neutrophil margination in dog lungs. *J Appl Physiol*, 63, 1253-1261.
272. Martin, B. A., Wiggs, B. R., Lee, S., & Hogg, J. C. (1987b). Regional differences in neutrophil margination in dog lungs. *J Appl Physiol*, 63, 1253-1261.
273. Massberg, S., Eisenmenger, S., Enders, G., Krombach, F., & Messmer, K. (1998). Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res.Exp.Med.(Berl)*, 198, 23-35.
274. Matsui, T., Heidaran, M., Miki, T., Popescu, N., La Rochelle, W., Kraus, M. et al. (1989). Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science*, 243, 800-804.
275. Matute-Bello, G., Liles, W. C., Steinberg, K. P., Kiener, P. A., Mongovin, S., Chi, E. Y. et al. (1999). Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). *J.Immunol.*, 163, 2217-2225.
276. McCuskey, R. S. & McCuskey, P. A. (1977). In vivo microscopy of the spleen. *Bibl.Anat*, 121-125.

-
277. McDonald, D. M. (1988). Neurogenic inflammation in the rat trachea. I. Changes in venules, leucocytes and epithelial cells. *J.Neurocytol.*, 17, 583-603.
278. McGann, J. K., Silver, L., Liesveld, J., & Palis, J. (1997). Erythropoietin-receptor expression and function during the initiation of murine yolk sac erythropoiesis. *Exp.Hematol.*, 25, 1149-1157.
279. McNagny, K. M., Pettersson, I., Rossi, F., Flamme, I., Shevchenko, A., Mann, M. et al. (1997). Thrombomucin, a novel cell surface protein that defines thrombocytes and multipotent hematopoietic progenitors. *J Cell Biol.*, 138, 1395-1407.
280. Melder, R. J., Koenig, G. C., Witwer, B. P., Safabakhsh, N., Munn, L. L., & Jain, R. K. (1996). During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat.Med.*, 2, 992-997.
281. Menger, M. D. (1994). [Microcirculation of gastric mucosa in pathogenesis of stomach ulcer]. *Zentralbl.Chir.*, 119, 1-10.
282. Menger, M. D., Bonkhoff, H., & Vollmar, B. (1996). Ischemia-reperfusion-induced pancreatic microvascular injury. An intravital fluorescence microscopic study in rats. *Dig.Dis.Sci.*, 41, 823-830.
283. Menger, M. D., Hammersen, F., Barker, J., Feifel, G., & Messmer, K. (1988). Tissue PO₂ and functional capillary density in chronically ischemic skeletal muscle. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 222, 631-636.
284. Menger, M. D., Hammersen, F., & Messmer, K. (1992). In vivo assessment of neovascularization and incorporation of prosthetic vascular biografts. *Thorac.Cardiovasc.Surg.*, 40, 19-25.
285. Menger, M. D., Hammersen, F., Walter, P., & Messmer, K. (1990). Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac.Cardiovasc.Surg.*, 38, 139-145.
286. Menger, M. D., Jaeger, S., Walter, P., Feifel, G., Hammersen, F., & Messmer, K. (1989). Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. *Diabetes*, 38 Suppl 1, 199-201.
287. Menger, M. D., Jager, S., Walter, P., Hammersen, F., & Messmer, K. (1990). A novel technique for studies on the microvasculature of transplanted islets of Langerhans in vivo. *Int.J Microcirc Clin.Exp.*, 9, 103-117.
288. Menger, M. D., Laschke, M., & Vollmar, B. (2006). Chamber Assays. In C.A.Staton, C. Lewis, & R. Bicknell (Eds.), *Angiogenesis Assays* (pp. 239-263). Chichester.
289. Menger, M. D., Marzi, I., & Messmer, K. (1991). In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur.Surg.Res.*, 23, 158-169.

290. Menger, M. D., Pattenier, J., Wolf, B., Jager, S., Feifel, G., & Messmer, K. (1992). Cryopreservation of islets of Langerhans does not affect angiogenesis and revascularization after free transplantation. *Eur.Surg.Res.*, 24, 89-96.
291. Menger, M. D., Vajkoczy, P., Beger, C., & Messmer, K. (1994). Orientation of microvascular blood flow in pancreatic islet isografts. *J Clin.Invest*, 93, 2280-2285.
292. Menger, M. D., Vajkoczy, P., Leiderer, R., Jager, S., & Messmer, K. (1992). Influence of experimental hyperglycemia on microvascular blood perfusion of pancreatic islet isografts. *J Clin.Invest*, 90, 1361-1369.
293. Menger, M. D., Wolf, B., Hobel, R., Schorlemmer, H. U., & Messmer, K. (1991). Microvascular phenomena during pancreatic islet graft rejection. *Langenbecks Arch.Chir*, 376, 214-221.
294. Menger, M. D., Yamauchi, J., & Vollmar, B. (2001). Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World J Surg.*, 25, 509-515.
295. Mern, D. S., Hasskarl, J., & Burwinkel, B. (2010). Inhibition of Id proteins by a peptide aptamer induces cell-cycle arrest and apoptosis in ovarian cancer cells. *Br.J Cancer*, 103, 1237-1244.
296. Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A., & McKercher, S. R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*, 290, 1779-1782.
297. Mikawa, T. & Fischman, D. A. (1992). Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 89, 9504-9508.
298. Miserocchi, G., Negrini, D., Del Fabbro, M., & Venturoli, D. (1993). Pulmonary interstitial pressure in intact in situ lung: transition to interstitial edema. *J.Appl.Physiol*, 74, 1171-1177.
299. Moore, A. & Khairallah, P. A. (1976). Further studies on angiotensin tachyphylaxis. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, 197, 575-581.
300. Moore, B. B., Kolodsick, J. E., Thannickal, V. J., Cooke, K., Moore, T. A., Hogaboam, C. et al. (2005). CCR2-Mediated Recruitment of Fibrocytes to the Alveolar Space after Fibrotic Injury. *American Journal of Pathology*, 166, 675-684.
301. Motley, H. L. & Cournand, A. (1947). The influence of short periods of induced acute anoxia upon pulmonary artery pressures in man. *Am J Physiol*, 150, 315-320.
302. Muller, W. A. (2002). Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest*, 82, 521-533.
303. Murayama, T., Tepper, O. M., Silver, M., Ma, H., Losordo, D. W., Isner, J. M. et al. (2002). Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp.Hematol.*, 30, 967-972.

304. Murray, P. D. F. (1932). The development in vitro of the blood of the early chick embryo. *R Soc Lond Ser, B*, III.
305. Murry, C. E., Field, L. J., & Menasche, P. (2005). Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation.*, 112, 3174-3183.
306. Murry, C. E., Giachelli, C. M., Schwartz, S. M., & Vracko, R. (1994). Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol.*, 145, 1450-1462.
307. Murry, C. E., Reinecke, H., & Pabon, L. M. (2006). Regeneration Gaps: Observations on Stem Cells and Cardiac Repair. *Journal of the American College of Cardiology*, 47, 1777-1785.
308. Mutin, M., Canavy, I., Blann, A., Bory, M., Sampol, J., & Dignat-George, F. (1999). Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood*, 93, 2951-2958.
309. Myers, T. O., Joyner, W. L., & Gilmore, J. P. (1988). Extravasation of macromolecules and vascular reactivity of microvessels in response to nicotine in the hamster. *Int J Microcirc Clin.Exp.*, 7, 139-153.
310. Negrini D. (1998). Intravital microscopy: Surface lung vessels and interstitial pressure. In S.Uhlig & A. E. Taylor (Eds.), *Methods in Pulmonary Research* (pp. 251-275).
311. Negrini, D., Passi, A., de Luca, G., & Miserocchi, G. (1996). Pulmonary interstitial pressure and proteoglycans during development of pulmonary edema. *Am.J.Physiol*, 270, H2000-H2007.
312. Neuringer, I. P. & Randell, S. H. (2004). Stem cells and repair of lung injuries. *Respir Res.*, 5, 6.
313. Nihlberg, K., Larsen, K., Hultgardh-Nilsson, A., Malmstrom, A., Bjermer, L., & Westergren-Thorsson, G. (2006). Tissue fibrocytes in patients with mild asthma: a possible link to thickness of reticular basement membrane? *Respir Res.*, 7:50., 50.
314. Noden D.M. (1991). Development of craniofacial blood vessels. In Feinberg R.N., Sherer G.K., & R. Auerbach (Eds.), *The Development of the vascular system* (pp. 1-24). Basel: Karger.
315. Nordin, U., Kallskog, O., Lindholm, C. E., & Wolgast, M. (1978). Trans-vascular fluid exchange in the tracheal mucosa. *Microvasc.Res.*, 15, 287-298.
316. O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M. et al. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 79, 315-328.
317. O'Reilly, M. S., Pirie-Shepherd, S., Lane, W. S., & Folkman, J. (1999). Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin anti-thrombin. *Science*, 285, 1926-1928.

318. Okamoto, R., Yajima, T., Yamazaki, M., Kanai, T., Mukai, M., Okamoto, S. et al. (2002). Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat.Med*, 8, 1011-1017.
319. Opitz, C. F. & Ewert, R. (2006). Dual ET(A)/ET(B) vs. selective ET(A) endothelin receptor antagonism in patients with pulmonary hypertension. *Eur.J Clin.Invest*, 36 Suppl 3, 1-9.
320. Orchard, C. H., Sanchez, d. L., & Sykes, M. K. (1983). The relationship between hypoxic pulmonary vasoconstriction and arterial oxygen tension in the intact dog. *J Physiol*, 338, 61-74.
321. Orlic, D. (2002). Stem cell repair in ischemic heart disease: an experimental model. *Int.J Hematol.*, 76 Suppl 1, 144-145.
322. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B. et al. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410, 701-705.
323. Ornitz, D. M. & Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol.*, 2, REVIEWS3005.
324. Pahernik, S., Langer, S., Botzlar, A., Dellian, M., & Goetz, A. E. (2001). Tissue distribution and penetration of 5-ALA induced fluorescence in an amelanotic melanoma after topical application. *Anticancer Res.*, 21, 59-63.
325. Papaioannou, V. E. & Hadjantonakis, A. K. (2004). Stem cells from early mammalian embryos. In S.Sell (Ed.), *Stem cells handbook* (pp. 19-31). Totowa NJ (USA): Humana Press.
326. Papenfuss, H. D., Gross, J. F., Intaglietta, M., & Treese, F. A. (1979). A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc.Res.*, 18, 311-318.
327. Pardanaud, L., Altmann, C., Kitos, P., Dieterlen-Lievre, F., & Buck, C. A. (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development*, 100, 339-349.
328. Pardanaud, L. & Dieterlen-Lievre, F. (1995). Does the paraxial mesoderm of the avian embryo have hemangioblastic capacity? *Anat Embryol (Berl)*, 192, 301-308.
329. Park, S., Tepper, O. M., Galiano, R. D., Capla, J. M., Baharestani, S., Kleinman, M. E. et al. (2004). Selective recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissues with increased neovascularization. *Plast.Reconstr.Surg*, 113, 284-293.
330. Pereira, R. F., Halford, K. W., O'Hara, M. D., Leeper, D. B., Sokolov, B. P., Pollard, M. D. et al. (1995). Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4857-4861.

331. Persano, L., Crescenzi, M., & Indraccolo, S. (2007). Anti-angiogenic gene therapy of cancer: current status and future prospects. *Mol.Aspects Med.*, 28, 87-114.
332. Persson, E., Bak, H., & Olsen, O. H. (2001). Substitution of valine for leucine 305 in factor VIIa increases the intrinsic enzymatic activity. *J Biol.Chem.*, 276, 29195-29199.
333. Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N. et al. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.*, 284, 1168-1170.
334. Petty, T. L. (2003a). Definition, epidemiology, course, and prognosis of COPD. *Clin Cornerstone.*, 5, 1-10.
335. Petty, T. L. (2003b). Overview. In M.A.Matthay (Ed.), *Acute Respiratory Distress Syndrome* (1st ed., pp. 1-6). New York, Basel: Marcel Dekker, Inc.
336. Pillarisetti, K. & Gupta, S. K. (2001). Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1)1: SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation*, 25, 293-300.
337. Polverini, P. J., Cotran, P. S., Gimbrone, M. A., Jr., & Unanue, E. R. (1977). Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature*, 269, 804-806.
338. Poole, T. J. & Coffin, J. D. (1989). Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp.Zool.*, 251, 224-231.
339. Powell, T. M., Paul, J. D., Hill, J. M., Thompson, M., Benjamin, M., Rodrigo, M. et al. (2005). Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc.Biol.*, 25, 296-301.
340. Praidou, A., Androudi, S., Brazitikos, P., Karakiulakis, G., Papakonstantinou, E., & Dimitrakos, S. (2010). Angiogenic growth factors and their inhibitors in diabetic retinopathy. *Curr.Diabetes Rev.*, 6, 304-312.
341. Prewitt, R. L. & Johnson, P. C. (1976a). The effect of oxygen on arteriolar red cell velocity and capillary density in the rat cremaster muscle. *Microvasc.Res.*, 12, 59-70.
342. Prewitt, R. L. & Johnson, P. C. (1976b). The effect of oxygen on arteriolar red cell velocity and capillary density in the rat cremaster muscle. *Microvasc.Res.*, 12, 59-70.
343. Prunier, F., Pfister, O., Hadri, L., Liang, L., Del, M. F., Liao, R. et al. (2007). Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 292, H522-H529.
344. Quan, T. E., Cowper, S. E., & Bucala, R. (2006). The role of circulating fibrocytes in fibrosis. *Curr Rheumatol.Rep.*, 8, 145-150.

345. Rafii, S. (2000). Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J.Clin.Invest*, 105, 17-19.
346. Rafii, S., Oz, M. C., Seldomridge, J. A., Ferris, B., Asch, A. S., Nachman, R. L. et al. (1995). Characterization of hematopoietic cells arising on the textured surface of left ventricular assist devices. *Ann.Thorac.Surg.*, 60, 1627-1632.
347. Ratajczak, M. Z., Reza, R., Wysoczynski, M., Yan, J., & Ratajczak, J. (2006). Modulation of the SDF-1-CXCR4 axis by the third complement component (C3)--implications for trafficking of CXCR4+ stem cells. *Exp Hematol.*, 34, 986-995.
348. Rathjen, J. & Rathjen, P. D. (2004). Embryonic stem cells. Isolation and application of pluripotent cells from pregastrulation mammalian embryo. In S.Sell (Ed.), *Stem cells handbook* (pp. 33-43). Totowa NJ, USA: Humana Press.
349. Redlitz, A., Daum, G., & Sage, E. H. (1999). Angiostatin diminishes activation of the mitogen-activated protein kinases ERK-1 and ERK-2 in human dermal microvascular endothelial cells. *J Vasc.Res.*, 36, 28-34.
350. Regelin, N., Heyder, S., Muralt, S., Ballazs, A., Laschke, M., Sybrecht, G. et al. (2007). Ischämie-Reperfusionsschaden ektop transplantierten Lungengewebes in der Rückenhautkammer zur *in vivo*-Mikroskopie der Homing endothelialer Progenitorzellen. In Innsbruck: Pneumouupdate.
351. Reinhold, H. S. & Endrich, B. (1986). Tumour microcirculation as a target for hyperthermia. *Int.J Hyperthermia*, 2, 111-137.
352. Reynolds, S. D., Giangreco, A., Hong, K. U., McGrath, K. E., Ortiz, L. A., & Stripp, B. R. (2004). Airway injury in lung disease pathophysiology: selective depletion of airway stem and progenitor cell pools potentiates lung inflammation and alveolar dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 287, L1256-L1265.
353. Reynolds, S. D., Giangreco, A., Power, J. H., & Stripp, B. R. (2000). Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol.*, 156, 269-278.
354. Reynolds, S. D., Hong, K. U., Giangreco, A., Mango, G. W., Guron, C., Morimoto, Y. et al. (2000). Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 278, L1256-L1263.
355. Riaz, A. A., Wan, M. X., Schaefer, T., Schramm, R., Ekberg, H., Menger, M. D. et al. (2002). Fundamental and distinct roles of P-selectin and LFA-1 in ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelium interactions in the mouse colon. *Ann.Surg.*, 236, 777-784.
356. Riboldi, E., Sozzani, S., & Presta, M. (2008). Dendritic cells and angiogenesis. In M.J.Parnham (Ed.), *Angiogenesis in Inflammation: Mechanisms and Clinical Correlates* (pp. 29-44). Basel, Boston, Berlin.

-
357. Risau, W. (1995). Differentiation of endothelium. *FASEB J*, 9, 926-933.
 358. Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386, 671-674.
 359. Risau, W. & Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.*, 11, 73-91.
 360. Rochefort, G. Y., Vaudin, P., Bonnet, N., Pages, J. C., Domenech, J., Charbord, P. et al. (2005). Influence of hypoxia on the domiciliation of mesenchymal stem cells after infusion into rats: possibilities of targeting pulmonary artery remodeling via cells therapies? *Respir Res.*, 6:125., 125.
 361. Rosenzweig, A. (2003). Endothelial Progenitor Cells. *The New England Journal of Medicine*, 348, 581-582.
 362. Roupie, E. (2000). Incidence of ARDS. *Intensive Care Med*, 26, 816-817.
 363. Rubanyi, G. M. (2000). *Angiogenesis in health and disease*. New York-Basel: M. Dekker, Inc.
 364. Rubinfeld, G. D., Caldwell, E., Peabody, E., Weaver, J., Martin, D. P., Neff, M. et al. (2005). Incidence and Outcomes of Acute Lung Injury. *The New England Journal of Medicine*, 353, 1685-1693.
 365. Rucker, M., Roesken, F., Vollmar, B., & Menger, M. D. (1998). A novel approach for comparative study of periosteum, muscle, subcutis, and skin microcirculation by intravital fluorescence microscopy. *Micro-vasc.Res.*, 56, 30-42.
 366. Rucker, M., Strobel, O., Vollmar, B., Roesken, F., & Menger, M. D. (2000). Vasomotion in critically perfused muscle protects adjacent tissues from capillary perfusion failure. *Am J Physiol Heart Circ.Physiol*, 279, H550-H558.
 367. Ryeom, S. & Folkman, J. (2009). Role of endogenous angiogenesis inhibitors in Down syndrome. *J Craniofac.Surg.*, 20 Suppl 1, 595-596.
 368. Sabin F.R. (1917). Origin and development of the primitive vessels of the chick and of the pig. *Carnergie Contrib Embryol*, 6, 61-124.
 369. Sack, F. U., Funk, W., Hammersen, F., & Messmer, K. (1987). Microvascular injury of skeletal muscle and skin after different periods of pressure induced ischemia. *Prog Appl Microcirc*, 12, 282-288.
 370. Sagara, S., Horie, Y., Anezaki, Y., Miyazawa, H., & Iizuka, M. (2010). Acute respiratory distress syndrome associated with severe ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.*, 16, 2440-2442.
 371. Salonen, R. O., Webber, S. E., & Widdicombe, J. G. (1988). Effects of neuropeptides and capsaicin on the canine tracheal vasculature in vivo. *Br.J.Pharmacol.*, 95, 1262-1270.

372. Samadikuchaksaraei, A. & Bishop, A. E. (2006). Derivation and characterization of alveolar epithelial cells from murine embryonic stem cells in vitro. *Methods Mol Biol.*, 330:233-48., 233-248.
373. Samadikuchaksaraei, A., Cohen, S., Isaac, K., Rippon, H. J., Polak, J. M., Bielby, R. C. et al. (2006). Derivation of distal airway epithelium from human embryonic stem cells. *Tissue Eng.*, 12, 867-875.
374. Sandison J.C. (1924). A new method for microscopic study of living growing tissue by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat.Rec.*, 28, 281-288.
375. Sandison J.C. (1928). The transparent chamber of the rabbit's ear giving a complete description of improved techniques of construction and introduction and general account of growth and behavior of living cells and tissues seen with the microscope. *Am J Anat*, 41, 447-472.
376. Santulli, G., Basilicata, M. F., De Simone, M., Del Giudice, C., Anastasio, A., Sorriento, D. et al. (2011). Evaluation of the anti-angiogenic properties of the new selective alphaVbeta3 integrin antagonist RGDechiHCit. *J Transl.Med.*, 9, 7.
377. Sata, M. (2003). Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling, and lesion formation. *Trends Cardiovasc.Med*, 13, 249-253.
378. Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhsa, T. et al. (2002). Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*, 8, 403-409.
379. Schannwell, C. M., Ott, G., Brehm, M., Bartsch, T., & Strauer, B. E. (2006). Fünf Jahre autologe intrakoronare Stammzelltransplantation. *Der Internist*, 47, 1087-1092.
380. Schmidt, M., Sun, G., Stacey, M. A., Mori, L., & Mattoli, S. (2003). Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol.*, 171, 380-389.
381. Schneider, P., Foitzik, T., Kahrau, S., Podufal, A., & Buhr, H. J. (2001). An experimental rat model for studying pulmonary microcirculation by in vivo videomicroscopy. *Microvasc.Res.*, 62, 421-434.
382. Schneiderman, J. & Loskutoff, D. J. (1991). Plasminogen activator inhibitors. *Trends Cardiovasc.Med.*, 1, 99-102.
383. Schoch, K. G., Lori, A., Burns, K. A., Eldred, T., Olsen, J. C., & Randell, S. H. (2004). A subset of mouse tracheal epithelial basal cells generates large colonies in vitro. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286, L631-L642.
384. Scholz, D., Cai, W. J., & Schaper, W. (2001). Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis.*, 4, 247-257.
385. Schueler, J. (1999). *Entwicklung und Charakterisierung humaner Tumormodelle durch orthotope Implantation*. FU Berlin.

386. Schultz & Letunic (2010). Tumour necrosis factor family. Simple Modular Architecture Research Tool [On-line]. Available:
387. Schumacher, B., Pecher, P., von Specht, B. U., & Stegmann, T. (1998). Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation*, 97, 645-650.
388. Seed, M. P. & Walsh, D. A. (2008). *Angiogenesis in inflammation: mechanisms and clinical correlates*. Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser.
389. Sell, S. (2006). Stem cells. What are they? Where do they come from? Why are they here? When do they go wrong? Where are they going? In S.Sell (Ed.), *Stem cells handbook* (1 ed., pp. 1-18). Totowa, NJ, USA: Humana Press.
390. Setoguchi, K., Misaki, Y., Kawahata, K., Shimada, K., Juji, T., Tanaka, S. et al. (2004). Suppression of T cell responses by chondromodulin I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitory factor: therapeutic potential in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 50, 828-839.
391. Shao, L. J., Shi, H. Y., Ayala, G., Rowley, D., & Zhang, M. (2008). Haploinsufficiency of the maspin tumor suppressor gene leads to hyperplastic lesions in prostate. *Cancer Res.*, 68, 5143-5151.
392. Shepard, J. M., Joyner, W. L., & Gilmore, J. P. (1987). Hypoxia does not alter angiotensin converting enzyme activity in hamster pulmonary microvessels. *Circ.Res.*, 61, 228-235.
393. Sheu, S. J., Bee, Y. S., Ma, Y. L., Liu, G. S., Lin, H. C., Yeh, T. L. et al. (2009). Inhibition of choroidal neovascularization by topical application of angiogenesis inhibitor vasostatin. *Mol. Vis.*, 15, 1897-1905.
394. Shi, Q., Rafii, S., Wu, M. H., Wijelath, E. S., Yu, C., Ishida, A. et al. (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 92, 362-367.
395. Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueno, T., Honma, T., Katoh, A. et al. (2001a). Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 103, 2776-2779.
396. Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueno, T., Honma, T., Katoh, A. et al. (2001b). Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 103, 2776-2779.
397. Sikora, L., Johansson, A. C., Rao, S. P., Hughes, G. K., Broide, D. H., & Sriramaraio, P. (2003). A murine model to study leukocyte rolling and intravascular trafficking in lung microvessels. *Am.J.Pathol.*, 162, 2019-2028.
398. Simons, M., Bonow, R. O., Chronos, N. A., Cohen, D. J., Giordano, F. J., Hammond, H. K. et al. (2000). Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation*, 102, E73-E86.

399. Slayton, W. B. & Spangrude, G. J. (2004). Adult stem cell plasticity. In K.Turksen (Ed.), *Adult stem cells* (1 ed., pp. 1-18). Totowa,NJ, USA: Humana Press.
400. Smith, T. L., Prazma, J., Coleman, C. C., Drake, A. F., & Boucher, R. C. (1993). Control of the mucosal microcirculation in the upper respiratory tract. *Otolaryngol.Head Neck Surg.*, 109, 646-652.
401. Sommer, N., Dietrich, A., Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Gudermann, T., Schulz, R. et al. (2008). Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur.Respir.J*, 32, 1639-1651.
402. Spencer, H., Rampling, D., Aurora, P., Bonnet, D., Hart, S. L., & Jaffe, A. (2005). Transbronchial biopsies provide longitudinal evidence for epithelial chimerism in children following sex mismatched lung transplantation. *Thorax*, 60, 60-62.
403. Sprent, J. (1974). Migration and Lifespan of Circulating B-Lymphocytes of Nude (nu/nu) Mice. In *Proc. First Intern. Workshop Nude Mice* (pp. 11-12). New York, Stuttgart: G. Fischer Verlag.
404. Springer, M. L., Brazelton, T. R., & Blau, H. M. (2001). Not the usual suspects: the unexpected sources of tissue regeneration. *J Clin Invest*, 107, 1355-1356.
405. Springer, T. A. (1994c). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76, 301-314.
406. Springer, T. A. (1994b). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76, 301-314.
407. Springer, T. A. (1994a). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.*, 76, 301-314.
408. Standal, T., Borset, M., & Sundan, A. (2004). Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp.Oncol.*, 26, 179-184.
409. Stanley, G., Harvey, K., Slivova, V., Jiang, J., & Sliva, D. (2005). Gano-derma lucidum suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-beta1 from prostate cancer cells. *Bio-chem.Biophys.Res.Comm.*, 330, 46-52.
410. Stegmann, T. J. (1998). FGF-1: a human growth factor in the induction of neoangiogenesis. *Expert.Opin.Investig.Drugs*, 7, 2011-2015.
411. Stegmann, T. J. & Hoppert, T. (1999). Combined Local Angiogenesis and Surgical Revascularization for Coronary Artery Disease. *Curr.Interv.Cardiol.Rep.*, 1, 172-178.
412. Stegmann, T. J., Hoppert, T., Schneider, A., Gemeinhardt, S., Kocher, M., Ibing, R. et al. (2000). [Induction of myocardial neoangiogenesis by human growth factors. A new therapeutic approach in coronary heart disease]. *Herz*, 25, 589-599.

413. Stein, E., Schoecklmann, H., & Daniel, T. O. (1997). Eph family receptors and ligands in vascular cell targeting and assembly. *Trends Cardiovasc.Med.*, 7, 329-334.
414. Steinberg, K. P., Milberg, J. A., Martin, T. R., Maunder, R. J., Cockrill, B. A., & Hudson, L. A. (1994). Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 150, 113-122.
415. Stewart, A. G. (2004). Emigration and immigration of mesenchymal cells: a multicultural airway wall. *European Respiratory Journal*, 24, 515-517.
416. Strauer, B. E., Brehm, M., Zeus, T., Kostering, M., Hernandez, A., Sorg, R. V. et al. (2002). Repair of Infarcted Myocardium by Autologous Intracoronary Mononuclear Bone Marrow Cell Transplantation in Humans. *Circulation*, 106, 1913-1918.
417. Strieth, S., von, J., V, Eichhorn, M. E., Enders, G., Krasnici, S., Thein, E. et al. (2005). A new animal model to assess angiogenesis and endocrine function of parathyroid heterografts in vivo. *Transplantation*, 79, 392-400.
418. Suratt, B. T., Cool, C. D., Serls, A. E., Chen, L., Varella-Garcia, M., Shpall, E. J. et al. (2003). Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*, 168, 318-322.
419. Sylvester, K. G. & Longaker, M. T. (2004). Stem cells: review and update. *Arch.Surg*, 139, 93-99.
420. Tabuchi, A., Mertens, M., Kuppe, H., Pries, A. R., & Kuebler, W. M. (2008). Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J.Appl.Physiol*, 104, 338-346.
421. Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M. et al. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat.Med.*, 5, 434-438.
422. Tarr, J. M., Young, P. J., Morse, R., Shaw, D. J., Haigh, R., Petrov, P. G. et al. (2010). A mechanism of release of calreticulin from cells during apoptosis. *J Mol.Biol.*, 401, 799-812.
423. Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., Shintani, S., Masaki, H. et al. (2002). Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 360, 427-435.
424. ten Have-Opbroek, A. A. W., Randell, S. H., & Stripp, B. R. (2004). Stem cells in lung morphogenesis, regeneration, and carcinogenesis. In S.Sell (Ed.), *Stem cells handbook* (pp. 455-472). Totowa NJ, USA: Humana Press.

-
425. Thaler, K., Mack, J. A., Berho, M., Grotendorst, G., Wexner, S. D., & Abramson, S. R. (2005). Coincidence of connective tissue growth factor expression with fibrosis and angiogenesis in postoperative peritoneal adhesion formation. *Eur.Surg.Res.*, 37, 235-241.
 426. Thurston, G. (2003). Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res.*, 314, 61-68.
 427. Tiemessen, M. M., Kunzmann, S., Schmidt-Weber, C. B., Garssen, J., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Knol, E. F. et al. (2003). Transforming growth factor-beta inhibits human antigen-specific CD4+ T cell proliferation without modulating the cytokine response. *Int.Immunol.*, 15, 1495-1504.
 428. Tomashefski, J. F. J., Davies, P., Boggis, C., Greene, R., Zapol, W. M., & Reid, L. M. (1983). The pulmonary vascular lesions of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Pathol.*, 112, 112-126.
 429. Tyml, K. & Budreau, C. H. (1991). A new preparation of rat extensor digitorum longus muscle for intravital investigation of the microcirculation. *Int.J Microcirc Clin.Exp.*, 10, 335-343.
 430. Uaesoontrachoon, K., Yoo, H. J., Tudor, E. M., Pike, R. N., Mackie, E. J., & Pagel, C. N. (2008). Osteopontin and skeletal muscle myoblasts: association with muscle regeneration and regulation of myoblast function in vitro. *Int.J Biochem.Cell Biol.*, 40, 2303-2314.
 431. Urbich, C. & Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res.*, 95, 343-353.
 432. Vajkoczy, P., Farhadi, M., Gaumann, A., Heidenreich, R., Erber, R., Wunder, A. et al. (2002). Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J Clin.Invest*, 109, 777-785.
 433. Vajkoczy, P., Lehr, H. A., Hubner, C., Arfors, K. E., & Menger, M. D. (1997). Prevention of pancreatic islet xenograft rejection by dietary vitamin E. *Am J Pathol.*, 150, 1487-1495.
 434. Vajkoczy, P., Menger, M. D., Vollmar, B., Schilling, L., Schmiedek, P., Hirth, K. P. et al. (1999). Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy. *Neoplasia.*, 1, 31-41.
 435. Vajkoczy, P., Olofsson, A. M., Lehr, H. A., Leiderer, R., Hammersen, F., Arfors, K. E. et al. (1995). Histogenesis and ultrastructure of pancreatic islet graft microvasculature. Evidence for graft revascularization by endothelial cells of host origin. *Am J Pathol.*, 146, 1397-1405.
 436. Vajkoczy, P., Schilling, L., Ullrich, A., Schmiedek, P., & Menger, M. D. (1998). Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifuorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb.Blood Flow Metab*, 18, 510-520.

-
437. Vajkoczy, P., Ullrich, A., & Menger, M. D. (2000). Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia*, 2, 53-61.
438. Vajkoczy, P., Vollmar, B., Wolf, B., & Menger, M. D. (1999). Effects of cyclosporine A on the process of vascularization of freely transplanted islets of Langerhans. *J Mol.Med.*, 77, 111-114.
439. Vaughn, S. P., Broussard, S., Hall, C. R., Scott, A., Blanton, S. H., Milunsky, J. M. et al. (2000). Confirmation of the mapping of the Camurati-Englemann locus to 19q13. 2 and refinement to a 3.2-cM region. *Genomics*, 66, 119-121.
440. Vollmar, B., Janata, J., Yamauchi, J., Wolf, B., Heuser, M., & Menger, M. D. (1999). Exocrine, but not endocrine, tissue is susceptible to microvascular ischemia/reperfusion injury following pancreas transplantation in the rat. *Transpl.Int.*, 12, 50-55.
441. Vollmar, B., Siegmund, S., & Menger, M. D. (1998). An intravital fluorescence microscopic study of hepatic microvascular and cellular derangements in developing cirrhosis in rats. *Hepatology*, 27, 1544-1553.
442. Wahl, S. M., Hunt, D. A., Wong, H. L., Dougherty, S., McCartney-Francis, N., Wahl, L. M. et al. (1988). Transforming growth factor-beta is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. *J Immunol.*, 140, 3026-3032.
443. Wahl, S. M., Wen, J., & Moutsopoulos, N. (2006). TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol.Rev.*, 213, 213-227.
444. Walter, D. H., Rochwalsky, U., Reinhold, J., Seeger, F., Aicher, A., Urbich, C. et al. (2007). Sphingosine-1-Phosphate Stimulates the Functional Capacity of Progenitor Cells by Activation of the CXCR4-Dependent Signaling Pathway via the S1P3 Receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27, 275-282.
445. Wang, K. X. & Denhardt, D. T. (2008). Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 19, 333-345.
446. Ware, L. B. & Matthay, M. A. (2000). The acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J Med*, 342, 1334-1349.
447. Warkentin, T. E. (2007). Drug-induced immune-mediated thrombocytopenia--from purpura to thrombosis. *N.Engl.J Med.*, 356, 891-893.
448. Webber, B. A., Lawson, D., & Cohen, C. (2008). Maspin and Mutant p53 expression in malignant melanoma and carcinoma: use of tissue microarray. *Appl Immunohistochem.Mol.Morphol.*, 16, 19-23.
449. Wei, G., Schubiger, G., Harder, F., & Muller, A. M. (2000). Stem cell plasticity in mammals and transdetermination in Drosophila: common themes? *Stem Cells.*, 18, 409-414.

450. Weibel, E. R. & Taylor, C. R. (1988). Design and structure of the human lung. In A.P.Fishman (Ed.), *Pulmonary diseases and disorders* (2 ed., pp. 11-60). New York, St. Louis, San Francisco: McGraw-Hill.
451. Weidner, N., Carroll, P. R., Flax, J., Blumenfeld, W., & Folkman, J. (1993). Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol.*, 143, 401-409.
452. Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R., & Folkman, J. (1991). Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N.Engl.J Med.*, 324, 1-8.
453. Werner, N., Kosiol, S., Schiegl, T., Ahlers, P., Walenta, K., Link, A. et al. (2005). Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *The New England Journal of Medicine*, 353, 999-1007.
454. Werner, N., Junk, S., Laufs, U., Link, A., Walenta, K., Bohm, M. et al. (2003). Intravenous Transfusion of Endothelial Progenitor Cells Reduces Neointima Formation After Vascular Injury. *Circulation Research*, 93, 17e-24.
455. West, J. A. & Daley, G. Q. (2004). Human embryonic stem cells. *Bone Marrow Transplant*, 33, 135.
456. Westermann, S., Vollmar, B., Thorlacius, H., & Menger, M. D. (1999). Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery*, 126, 881-889.
457. Widdicombe, J. (1993a). The airway vasculature. *Exp.Physiol*, 78, 433-452.
458. Widdicombe, J. G. (1993b). *Exp.Physiology*, 78, 433.
459. Wollert, K. C., Meyer, G. P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C. et al. (2004). Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *The Lancet*, 364, 141-148.
460. Wood, H. B., May, G., Healy, L., Enver, T., & Morriss-Kay, G. M. (1997). CD34 expression patterns during early mouse development are related to modes of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis. *Blood*, 90, 2300-2311.
461. Wright, D. E., Bowman, E. P., Wagers, A. J., Butcher, E. C., & Weissman, I. L. (2002). Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp.Med.*, 195, 1145-1154.
462. Xu, Q., Zhang, Z., Davison, F., & Hu, Y. (2003). Circulating progenitor cells regenerate endothelium of vein graft atherosclerosis, which is diminished in ApoE-deficient mice. *Circ.Res*, 93, e76-e86.
463. Yamada, M., Kubo, H., Ishizawa, K., Kobayashi, S., Shinkawa, M., & Sasaki, H. (2005). Increased circulating endothelial progenitor cells in patients with bacterial pneumonia: evidence that bone marrow derived cells contribute to lung repair. *Thorax*, 60, 410-413.

-
464. Yamada, M., Kubo, H., Kobayashi, S., Ishizawa, K., Numasaki, M., Ueda, S. et al. (2004). Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol.*, 172, 1266-1272.
465. Yamaguchi, J., Kusano, K. F., Masuo, O., Kawamoto, A., Silver, M., Murasawa, S. et al. (2003). Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*, 107, 1322-1328.
466. Yamaguchi, K., Nishio, K., Sato, N., Tsumura, H., Ichihara, A., Kudo, H. et al. (1997). Leukocyte kinetics in the pulmonary microcirculation: observations using real-time confocal luminescence microscopy coupled with high-speed video analysis. *Lab Invest*, 76, 809-822.
467. Yamauchi, J. I., Vollmar, B., Wolf, B., & Menger, M. D. (1999). Role of TNF-alpha in local surgical trauma-induced microvascular dysfunction. *Dig.Surg*, 16, 400-406.
468. Yamura, H., Suzuki, M., & Sato, H. (1971). Transparent chamber in the rat skin for studies on microcirculation in cancer tissue. *Gann*, 62, 177-185.
469. Yano, M., Iwama, A., Nishio, H., Suda, J., Takada, G., & Suda, T. (1997). Expression and function of murine receptor tyrosine kinases, TIE and TEK, in hematopoietic stem cells. *Blood*, 89, 4317-4326.
470. Yew, T. L., Hung, Y. T., Li, H. Y., Chen, H. W., Chen, L. L., Tsai, K. S. et al. (2010). Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38MAPK activation. *Cell Transplant*.
471. Yu, J. C., Li, W., Wang, L. M., Uren, A., Pierce, J. H., & Heidaran, M. A. (1995). Differential requirement of a motif within the carboxyl-terminal domain of alpha-platelet-derived growth factor (alpha PDGF) receptor for PDGF focus forming activity chemotaxis, or growth. *J Biol.Chem.*, 270, 7033-7036.
472. Zadeh, G., Koushan, K., Baoping, Q., Shannon, P., & Guha, A. (2010). Role of angiopoietin-2 in regulating growth and vascularity of astrocytomas. *J Oncol.*, 2010, 659231.
473. Zander, D. S., Baz, M. A., Cogle, C. R., Visner, G. A., Theise, N. D., & Crawford, J. M. (2005). Bone marrow-derived stem-cell repopulation contributes minimally to the Type II pneumocyte pool in transplanted human lungs. *Transplantation.*, 80, 206-212.
474. Zander, D. S., Cogle, C. R., Theise, N. D., & Crawford, J. M. (2006). Donor-derived type II pneumocytes are rare in the lungs of allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Ann Clin Lab Sci.*, 36, 47-52.
475. Zavadil, J. & Bottinger, E. P. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene.*, 24, 5764-5774.

- 476. Zhang, M., Volpert, O., Shi, Y. H., & Bouck, N. (2000). Maspin is an angiogenesis inhibitor. *Nat.Med.*, 6, 196-199.
- 477. Zhang, N., Sanders, A. J., Ye, L., & Jiang, W. G. (2009). Vascular endothelial growth inhibitor in human cancer (Review). *Int.J Mol.Med.*, 24, 3-8.
- 478. Zweifach, B. W. (1954). Direct observation of the mesenteric circulation in experimental animals. *Anat.Rec.*, 120, 277-291.
- 479. Zweifach, B. W. (1973). The microcirculation in the intestinal mesentery. *Microvasc.Res.*, 5, 363-367.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die zur Entstehung dieser Arbeit mit beigetragen haben:

Ganz herzlich danke ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Jürg Hamacher für seine rundum gelungene, wundervolle Betreuung, seine ständige Unterstützung und vor allem seine überaus menschliche, herzliche und humorvolle Art, ohne die ich wahrscheinlich niemals so begeistert von dem Projekt gewesen wäre. Ich danke ihm für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes zu arbeiten. Durch sein ansteckendes Interesse und die Begeisterung für die Forschung hat er mein Interesse und meine Freude am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt.

Mein besonderer Dank gilt Susanne Heyder. Sie hat den ersten Teil meiner Versuche betreut, mir die Operationstechnik am Mikroskop, den Bau der Rückenhautkammern und die Intravitalmikroskopie beigebracht. Ihre fachliche Kompetenz und ihre guten Ideen haben den Versuchsaufbau maßgeblich beeinflusst.

Herrn Prof. Dr. med. MD Menger, Herrn PD Dr. med. Matthias Laschke und Frau Dr. med. Michaela Amon möchte ich für die konstruktive Zusammenarbeit und die guten Ideen danken. Ihre ruhige und sachliche Art, ihr Wissen und ihre große Erfahrung haben viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch von ihnen habe ich viel über wissenschaftliches Arbeiten lernen dürfen und die regen Diskussionen und „brain stormings“ zu neuen Versuchen waren von unschätzbarem Wert.

Für die tatkräftige Unterstützung und die schöne Zusammenarbeit im Labor danke ich Elisabeth Gluding, Janine Becker, Dr. Claudia Scheuer und Ruth Nickels. Ohne ihre technische Hilfe, ihre Unterstützung bei den Versuchen und der Erstellung von histologischen Präparaten wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Sie sind dafür verantwortlich, dass ich die Zeit im Homburger Labor immer in sehr guter Erinnerung behalten werde.

Annika Ballasz und Susanne Heyder danke ich dafür, einige der Rückenhautkammerversuche mit mir durchzuführen.

Meinen Studienfreunden in Homburg wie Miriam Diehl, Sabrina Coroneo, Lena Dippel, Siri Blomberg, Simone Gadinger, Tobias Hodapp, Sigrun Berger, Petra Roth und vor allem auch Verena Vedder gilt ein ganz herzliches Dankeschön, weil sie mich während meines Studiums und der Zeit im Labor begleitet und unterstützt haben, immer für mich da waren, stets ein offenes Ohr hatten und viel Verständnis zeigten.

Meiner langjährigen Osnabrücker Freundin Angela Schaper gilt ebenfalls ein ganz liebes Dankeschön. Wir haben zeitgleich viele gemeinsame Hürden genommen und uns gegenseitig dabei immer zur Seite gestanden.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Walliser Freunden Johanna Rasthofer, Darja Sippel, Marie-Luise Kopka und Andrea Meinel für die Motivation, Unterstützung und das Verständnis für die Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein persönlichster Dank geht an meine Familie: Meinen Eltern danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen in jeder Lebenssituation und die uneingeschränkte Unterstützung bei all meinen Vorhaben. Sie sind mir in vielen Dingen ein Vorbild und meine engsten Vertrauten. Ich danke ihnen für die Ermöglichung meines Studiums, meiner zahlreichen Auslandsaufenthalte und der Verwirklichung meiner Träume. Meiner Mutter Petra Regelin danke ich ganz herzlich für das Gegenlesen des gesamten Textes und die ausdauernde Geduld und gute Motivation. Meinem Vater Werner Schmidt danke ich ebenfalls für die kontinuierliche Motivation und die Unterstützung in allen Lebenslagen. Meinen lieben Geschwistern Thilo, Beke und Justus Regelin danke ich für den starken Zusammenhalt untereinander und die gegenseitige, starke Unterstützung bei unseren unterschiedlichen Lebenswegen. Sie waren mir bei dieser Arbeit besonders bei computerspezifischen Fragen und bei der Texterfassung eine große Hilfe. Zuletzt möchte ich meiner lieben Großmutter Eva-Maria Hagenberg danken, für das stete Interesse, die selbstlose Unterstützung und gute Beratung in vielerlei Situationen. Sie ist mir immer wieder ein großes Vorbild in vielen Dingen.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Nora Anne Regelin

Geburtsdatum: 29.03.1981

Geburtsort: Hamburg

Familienstand: Ledig

Konfession: Römisch-Katholisch

Nationalität: Deutsch

Eltern: Dr. rer. nat. Werner Schmidt, Chemiker und Petra Regelin, Lehrerin

Schulische Ausbildung:

1987-1989 Grundschule Weinheim

1989-1991 Deutsche Schule Den Haag

1992-1993 Orientierungsstufe Dom Osnabrück

1993-1997 Graf-Stauffenberg-Gymnasium Osnabrück

1997-1998 Ausstauschjahr an der Ironton High School, Ironton, Ohio, USA

1998-2000 Graf-Stauffenberg-Gymnasium Osnabrück

Mai 2000 Erwerb der Hochschulreife

Universitäre Ausbildung:

Oktober 2000: Immatrikulation an der Universität des Saarlandes, Humanmedizin

2003-2004 Auslandsjahr im Rahmen des Erasmus-Programmes an der Universität Valencia, Spanien

08.06-11.06 Praktisches Jahr an den Universitätskliniken des Saarlandes, chirurgische Abteilung

12.06-03.07 Unterassistentin Innere Medizin am Kantonsspital Luzern, Schweiz

04.07-07.07 Unterassistentin Geburtshilfe und Gynäkologie am Spitalzentrum Oberwallis, Visp, Schweiz

Praktika:

07.2004 Gynäkologie, Universitätsklinik Valencia, Spanien

09.2004 Innere Medizin, Asklepios Kliniken, Hamburg

03.2005 pädiatrische Intensivmedizin, Universitätsklinik der Marshall Medical School, Huntington, West Virginia, USA

07-09.2005 medizinische Entwicklungshilfe in Guatemala

03.2006 Allgemeinmedizin, Praxis Dr. med. J. Jäger, Blieskastel

Postervorstellungen:

DGP Nürnberg 29.03.-01.04.06

Implantation von Lungengewebe in die Rückenhautkammer der Maus als Modell zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der pulmonalen Mikrozirkulation

ERS München 02.-06.09.06

Microvascular reactivity on inspired oxygen fraction of pulmonary tissue grafts

Vorträge:

Wintersymposium - chirurgische Forschung-, Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes 15.12.05

Lungentransplantation, Angiogenese und Vasoreaktivität

Pneumouupdate Innsbruck 10.06.2006

Das Rückenhautkammermodell zur *in vivo*-Analyse des Mikrogefäßsystems der Lunge: Validierung der spezifischen Vasoreaktivität durch unterschiedliche inspiratorische Sauerstofffraktionen

DGP Mannheim 14.-17.03.07

Ischämie-Reperfusionsschaden ektop transplantierten Lungengewebes in der Rückenhautkammer zur *in vivo*-Mikroskopie des Homing endothelialer Progenitorzellen

Pneumouupdate Innsbruck 08.-09.06.2007

Homing endothelialer Progenitorzellen im ektopen Lungengewebe nach Ischämie-Reperfusionsschaden in der Rückenhautkammer

Stellen:

01.07.2008-30.06.09 Assistenzärztin in der Geburtshilfe und Gynäkologie, Spitalzentrum Oberwallis, Visp, Schweiz

01.07.09-31.12.09 Beendigung der Disseration

01.01.2010-02.01.11 Assistenzärztin Pädiatrie Spitalzentrum Oberwallis, Visp, Schweiz